

**IMPACT D'AGENTS ANTICHOLINERGIQUES SUR DIFFÉRENTS
PARAMÈTRES DES RYTHMES CIRCAIDIENS AVIAIRES**

par

Richard Brunet

Thèse présentée au département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 1997



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-26376-2

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Les soussignés certifient qu'ils ont lu et acceptent la thèse intitulée « Impact d'agents anticholinergiques sur différents paramètres des rythmes circadiens aviaires » et que par conséquent, monsieur Richard Brunet a rempli les exigences menant à l'obtention du diplôme de *Philosophiae doctor es sciences*.

Jean-Marie Bergeron (Biologie), directeur

Jacques Bovet (Biologie, U. Laval), co-directeur

Adrien Beaudoin (Biologie), membre

Brian Talbot (Biologie), membre

Claude Thellen (Ministère de l'Environnement et de la Faune), examinateur externe

À tous ceux et celles qui doivent ou devront
faire preuve de tenacité et de courage pour
entreprendre et terminer leur doctorat.

SOMMAIRE

Aujourd'hui, les OPs représentent le plus grand groupe d'insecticides connu et ils prédominent dans le contrôle des espèces nuisibles. Ils sont utilisés dans une grande variété d'habitats tels que les milieux agricoles, les forêts, les milieux humides, les industries, les cultures maraîchères et les potagers. Les pesticides représentent un moyen très efficace de lutte contre les espèces nuisibles. Par contre, ils ont également le potentiel de provoquer des effets toxiques chez les espèces non-visées. Les OPs inhibent entre autre, l'activité hydrolytique des cholinestérases, et plus particulièrement celle de l'acétylcholinestérase (AChE), en phosphorylant le site actif de l'enzyme. L'effet général d'une exposition aux OPs sur le comportement est un malaise global qui se manifeste le plus souvent par une réduction d'un très grand nombre de comportements. Les rythmes circadiens font également partie des paramètres affectés par une exposition aux OPs. Tout événement physiologique ou comportemental qui se répète chaque jour est réglé par une horloge biologique que l'on dit circadienne. La sensibilité extrême des rythmes circadiens aux modifications environnementales et physiologiques est généralement reconnue. L'organisme doit intégrer les différents stimuli exogènes et endogènes afin de maintenir l'ajustement de ses rythmes biologiques. Ainsi tout agent chimique perturbant un organe ou une fonction physiologique pourra perturber les rythmes circadiens. De plus, l'innervation du centre de contrôle de la rythmicité circadienne étant cholinergique en partie, tout agent chimique provoquant l'inhibition de l'AChE pourra également perturber les rythmes chronobiologiques de l'organisme. L'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence le potentiel des rythmes circadiens comme nouvel outil de suivi et de détection des impacts provoqués par les OPs.

De façon générale, les résultats présentés dans ce document démontrent le bon potentiel d'utilisation des rythmes circadiens à titre d'outils pour la détection et le suivi des effets à long terme d'une exposition aux agents anticholinergiques chez les oiseaux. Le premier chapitre présente les premières évidences montrant que les agents anticholinergiques perturbent les rythmes circadiens. Un mélange de deux produits anesthésiants, le sécobarbitol et l'alpha-chloralose (anticholinergique), cause une réduction du niveau d'activité, perturbe la distribution journalière du niveau d'activité ainsi que la période du rythme d'activité des Carouges à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). D'autre part, il a été

déterminé qu'une période d'acclimatation de 15 jours dans la cage expérimentale est préférable avant de débiter les tests d'intoxication, ceci afin d'éliminer l'impact d'un changement d'environnement sur les rythmes circadiens.

Le deuxième chapitre présente les effets d'une autre classe d'agents anticholinergiques: les insecticides organophosphorés (OPs). Nous avons établi une liste des symptômes d'intoxication des Carouges à épauettes en fonction de la dose et de leur apparition dans le temps, suite à une exposition au diméthoate. Le diméthoate induit une diminution importante du niveau d'activité des oiseaux, dont la vitesse d'apparition et la durée des effets varient en fonction de la dose. Les symptômes d'intoxication disparaissent en moins de 13 heures, alors que le niveau d'activité des oiseaux demeure perturbé pendant plusieurs jours. Ces résultats démontrent que les symptômes d'intoxication peuvent s'avérer utiles pour déterminer le degré d'intoxication, mais que le taux d'activité des oiseaux est un outil plus sensible pour estimer la durée des effets des OPs.

Au troisième chapitre, nous avons établi les effets à long terme du diméthoate sur le rythme circadien d'activité de trois espèces d'oiseaux granivores. Le pesticide engendre une diminution du niveau d'activité, des modifications dans la distribution journalière du niveau d'activité, et un éloignement de la période d'activité du cycle jour-nuit de 24 heures. Ces perturbations persistent pendant 9 à 12 jours, ce qui pourrait amoindrir leur capacité à se nourrir et les rendre plus vulnérables face à d'éventuels prédateurs.

Au chapitre 4, nous avons établi les conditions expérimentales qui nous permettront de suivre la température corporelle des oiseaux à l'aide d'un émetteur thermosensible externe de longue portée. Les émetteurs externes enregistrent la température dermique (T_s), une mesure qui diffère de la température corporelle (T_b) des individus, et qui est influencée par la température ambiante et par des changements dans le niveau d'activité des oiseaux. Parmi six positions différentes sur le Carouge à épauettes, un émetteur fixé à la base du cou, au-dessus de la veine jugulaire, procure les mesures de T_s les plus stables dans le temps et les plus près de T_b . Nous avons établi deux équations permettant d'extrapoler T_b à partir de T_s , qui tiennent compte de la température ambiante et du poids des oiseaux. Ces résultats permettront de valider l'utilisation d'émetteurs externes pour évaluer l'impact

des facteurs environnementaux et des agents toxiques sur la température corporelle des oiseaux en milieu naturel.

Au chapitre 5, nous avons utilisé le protocole d'enregistrement de la température corporelle décrit au chapitre 4 pour mettre en évidence l'impact du diméthoate sur les rythmes circadiens de température de l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*). Le pesticide cause une variation accrue de la période autour de 24 heures, une diminution de l'amplitude de l'oscillation jour-nuit de la température et une augmentation de la température moyenne nocturne. Nous avons établi deux relations entre les paramètres circadiens de la température corporelle et le pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) cérébrale mesurée après 24 heures; l'inhibition de l'AChE augmente avec une diminution de l'amplitude de l'oscillation du cycle et avec une augmentation de la température moyenne nocturne. Ces résultats suggèrent que la méthode du suivi de la température corporelle, étant moins variable que l'analyse de l'activité de l'AChE cérébrale, pourrait être utilisée pour évaluer le niveau d'exposition aux OPs et les risques de mortalité.

La plupart des mesures d'inhibition de l'AChE cérébrale sont effectuées plus de 24 heures après une exposition à un pesticide. Au chapitre 6, nous avons exploré l'impact à court terme du diméthoate sur l'activité de l'AChE cérébrale du vacher (*Molothrus ater*). Des oiseaux ont été euthanasiés toutes les deux heures après avoir reçu une dose sous létale du pesticide. L'AChE atteint son niveau le plus bas 4 à 6 heures après l'exposition, soit en moyenne 30% du niveau d'AChE normal. Le froid n'amplifie pas l'effet inhibiteur du diméthoate, mais rallonge la période nécessaire au rétablissement de l'activité de l'AChE cérébrale à son niveau normal.

Au dernier chapitre, nous avons comparé les effets à long terme du diméthoate sur les rythmes circadiens d'activité et de température des Pigeons (*Columba livia*). Suite à une exposition au produit, les périodes des cycles d'activité et de température s'éloignent davantage de 24 heures, le niveau moyen d'activité diurne est fortement diminué, alors que le niveau moyen d'activité nocturne ne change pas. La température moyenne diurne n'est pas affectée par le pesticide, alors que la température moyenne nocturne augmente significativement. De plus, le pesticide cause une augmentation de la variation de la

température et du niveau d'activité pendant la phase de repos et dans le temps nécessaire pour atteindre la température minimale nocturne. Tous ces effets persistent au moins pendant 10 jours, suivis d'une phase de récupération de quelques jours. Les oiseaux qui n'ont montré aucun signe de rétablissement de leurs rythmes sont décédés avant la fin de l'expérience. Ces résultats démontrent que le suivi simultané des rythmes circadiens de température et d'activité nous procure une vision plus détaillée des effets des pesticides anticholinergiques.

L'ensemble de ces travaux démontre que les rythmes circadiens pourraient contribuer grandement à l'étude des impacts des pesticides organophosphorés sur les espèces non visées telles que les oiseaux. La mise au point de la technique du suivi de la température corporelle à l'aide d'émetteurs externes de longue portée permettra d'étendre ces travaux effectués en laboratoire à des études sur le terrain, c'est-à-dire sous des conditions reproduisant des situations réelles d'intoxication par des épandages de pesticide sur les forêts et dans les champs agricoles.

REMERCIEMENTS

J'adresse des remerciements particuliers à mes directeurs de recherche: le Dr Jacques Bovet du département de biologie de l'Université Laval et le Dr Jean-Marie Bergeron du département de biologie de l'Université de Sherbrooke qui m'ont appuyé, conseillé et encouragé tout au long de mes travaux. Il en est de même pour mes conseillers le Dr Adrien Beaudoin et le Dr Brian Talbot qui par leurs conseils et leur support technique m'ont permis de mener à bien mon projet de recherche. Merci au Dr Don Thomas pour ses conseils et sa collaboration. Je remercie aussi le Dr André Cyr sans qui toutes ces recherches n'auraient pu commencer.

Je remercie tous mes collègues et collaborateurs de travail de l'université et d'ailleurs qui ont participé aux expérimentations: Nathalie Beaudoin, Nathalie Caza, Jacques Dumais, Carole Girard, Nathalie Guérard, Caroline Hallé, Julie McDuff, Nathalie Perron et Isabelle Pouliot.

Je remercie aussi tous ceux qui avec beaucoup de patience ont participé à la révision de la thèse et des articles: Carole Girard, Julie McDuff, Maryse Picher, ainsi que tous les réviseurs anonymes.

Un merci très spécial à Yves Picher et Patrick Cliche, pour leur ingéniosité et leur support technique.

Je suis reconnaissant envers tous les gens qui ont généreusement aidé à capturer les oiseaux: Denise Brunet, Nathalie Brunet, Yvon Brunet, Stéphane Deshaies, Marc Gauthier, Julie McDuff, Marcel McDuff, Micheline McDuff, Sébastien McDuff, Yves St-Jean et Yvette St-Jean.

Au Dr Pierre Mineau, un grand merci pour toutes les discussions et les idées partagées, c'est à lui que l'on doit l'idée d'utiliser la télémétrie et le suivi de la température corporelle comme indice d'exposition aux pesticides organophosphorés.

Je suis redevable au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) et à l'Université de Sherbrooke qui m'ont octroyé des bourses d'études supérieures ainsi que du financement pour la réalisation de mon projet de recherche.

Pour Julie McDuff complice depuis longtemps dans mes recherches, ta fougue, ton dynamisme, ta méticulosité et ta persévérance, m'ont encouragé souvent malgré toi. Tu as toute ma reconnaissance. Ta présence est toujours appréciée et me fait honneur. Tu me surprends toujours, longue vie à notre «team». Le tour du monde c'est pour demain !

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
INTRODUCTION.....	1
1 LES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.....	1
1.1 Historique.....	1
1.2 Mode d'action.....	2
1.3 Symptômes d'intoxication.....	3
1.4 Impact des OPs sur le comportement.....	3
1.5 Impact des OPs sur les rythmes circadiens.....	4
1.6 Influence de la température ambiante sur la toxicité des OPs.....	6
2 MESURE DES EFFETS INHIBITEURS DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.....	7
2.1 Dosage de l'acétylcholinestérase cérébrale.....	7

2.2	Dosage de l'acétylcholinestérase cérébrale: le revers de la médaille.....	8
2.3	Utilisation des rythmes circadiens pour évaluer les impacts des OPs.....	9
2.3.1	Hypothèse et objectif de travail.....	10
3	TOXICITÉ DES PRODUITS UTILISÉS.....	11
3.1	Alpha-choralose.....	11
3.2	Diméthoate.....	12
4	CHEMINEMENT.....	13

CHAPITRE 1

	L'IMPACT DE L'ALPHA-CHLORALOSE ET DU SÉCO-BARBITAL SUR L'ALIMENTATION ET LES RYTHMES CIRCADIENS DU CAROUGE À ÉPAULETTES.....	17
	Résumé.....	17
	Abstract.....	20
	Introduction.....	20
	Materials and Methods.....	22
	Results.....	23
	Discussion.....	31
	Acknowledgements.....	33
	References.....	33
	Informations supplémentaires.....	39

CHAPITRE 2

L'IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LES RYTHMES CIRCA- DIENS DE TROIS ESPÈCES D'OISEAUX GRANIVORES.....40

Résumé.....	40
Abstract.....	43
Introduction.....	43
Materials and Methods.....	44
Results.....	46
Discussion.....	54
References.....	56
Informations supplémentaires.....	58

CHAPITRE 3

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LE COMPORTEMENT ET LE TAUX D'ACTIVITÉ DU CAROUGE À ÉPAULETTES (*AGELAIUS PHOENICEUS*).....59

Résumé.....	60
Abstract.....	62
Introduction.....	62
Materials and Methods.....	64
Animals.....	64
Experiment A: Symptoms of intoxication of red-winged blackbirds to dimethoate.....	64

Experiment B: Impact of dimethoate on red-winged blackbirds' activity level.....	65
Statisticals tests.....	65
Results.....	66
Time- and dose-dependent symptoms of intoxication to dimethoate.....	66
Impact of dimethoate on the activity of red-winged blackbirds.....	71
Discussion.....	75
Acknowledgements.....	78
References.....	78
Informations supplémentaires.....	82

CHAPITRE 4

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE SUIVI DE LA TEMPÉRATURE CORPORELLE CHEZ CERTAINES ESPÈCES D'OISEAUX.....	83
--	-----------

Résumé.....	84
Abstract.....	86
Introduction.....	86
Materials and Methods.....	88
Experimental birds.....	88
Temperature measurements.....	88
Experimental procedures.....	89
Results.....	90

Discussion.....	97
Literature cited.....	99

CHAPITRE 5

IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LE RYTHME CIRCADIE DE TEMPÉRATURE CORPORELLE DE L'ÉTOURNEAU SANSONNET (<i>STURNUS VULGARIS</i>)	103
--	-----

Résumé.....	104
Abstract.....	106
Introduction.....	106
Materials and Methods.....	108
Experimental birds.....	108
Experimental procedures.....	108
Data analysis.....	109
Results.....	109
Discussion.....	116
Literature cited.....	119
Informations supplémentaires.....	123

CHAPITRE 6

IMPACT DE LA TEMPÉRATURE AMBIANTE SUR LE RÉ- TABLISSEMENT DE L'ACTIVITÉ DE L'ACÉTYLCHOLI- NESTÉrase CÉRÉBRALE DU VACHER SUITE À UNE EX- POSITION À UN PESTICIDE ORGANOPHOSPHORÉ.....	124
---	-----

Résumé.....	125
Introduction.....	127
Materials and Methods.....	128
Results and discussion.....	129
Acknowledgements.....	133
References.....	134
Informations supplémentaires.....	136

CHAPITRE 7

EFFETS DU DIMÉTHOATE SUR LES RYTHMES CIRCADIENS DE TEMPÉRATURE CORPORELLE ET D'ACTIVITÉ DU PIGEON (<i>COLUMBIA LIVIA</i>) EN FONC- TION DU TEMPS.....	137
--	------------

Résumé.....	137
Abstract.....	140
Introduction.....	140
Materials and Methods.....	142
Experimental birds.....	142
Experimental procedures.....	142
Data analysis.....	143
Results.....	143
Discussion.....	154
Acknowledgements.....	156
References.....	156

Informations supplémentaires.....	160
CONCLUSION	162
BIBLIOGRAPHIE	169
ANNEXE 1	
INFORMATIONS ADDITIONNELLES CONCERNANT L'ACÉ- TYLCHOLINESTÉrase	183
ANNEXE 2	
MÉTHODE D'ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase CÉRÉbraLE	188
1. Principe de la méthode.....	160
2. Préparation des réactifs.....	160
3. Préparation des échantillons.....	160
4. Dosage de l'activité enzymatique.....	160

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AOU	American Ornithologists' Union
ASChi	Acétylthiocholine iodée
BW	Body weight
ChE	Cholinestérase
DL ₅₀	Dose létale médiane
DTNB	Acide dithiodinitrobenzoïque
ECA	Environment Council of Alberta
EEG	Électro-encéphalogramme
LD	Light: Dark
L:N	Lumière: Noireur
OP	Organophosphoré
PF	Poids frais
PH/h	Perch hoppings / hour
REM	Rapid eyes mouvement
Ta	Température ambiante
Tb	Température corporelle
Ts	Température cutanée

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

1. Control bird measurements of period length (h), activity level (perch hops s^{-1}) and weight variation ($g\ day^{-1}$) for Song Sparrows, Savannah Sparrows and American Goldfinches at each stage of 15 days.....47
2. Treated bird measurements of period length (h), activity level (perch hops h^{-1}), recovery period (days), weight variation (g), mean amount of seeds ingested ($g\ day^{-1}$) and approximate doses of dimethoate ingested ($mg\ kg^{-1}$ body weight (BW)) for Song Sparrows, Savannah Sparrows, and American Goldfinches at each stage of 15 days.....48

CHAPITRE 3

1. Mean daily perch-hopping activity level of red-winged blackbirds recorded before and after exposure to a sublethal dose of dimethoate.....67

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

1. Comparison between the mean (\pm SEM) daily food uptakes of the control birds and the birds (n=15) intoxicated on day 3 (n=15) or 15 (n=15), over 30 days of experiment.....24
2. Comparison between the mean daily activity level (% number of perch hoppings/h or %PH/h) of the control and the treated birds.....26
3. Typical distribution of the daily activities (% number of perch hoppings/h or %PH/h) of a control bird on days 2 and 17, of a treated bird of group B on days 2 and 5, and of a treated bird of group C on days 2 and 17, over 30 days of the experiment.....27
4. Actograms of perch-hopping activity of Red-winged blackbirds.....29
5. Comparison between the mean period lengths of control (n=15) and birds intoxicated on day 3 (n=8) or day 15 (n=11) over 30 days of experiment.....30

CHAPITRE 2

1. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated American Goldfinches.....49
2. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated Savannah Sparrows.....50
3. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated Song Sparrows.....51

4. Mean daily activity level of the treated birds measured as the mean number of perch triggerings per hour ($g \pm SD$) for the three bird species at each stage of 15 days.....52
5. Mean body weight variation ($g \pm SD$) between the first and the last days of the experiment of the treated and control birds.....53

CHAPITRE 3

1. List of the symptoms of intoxication of red-winged blackbirds to ingested dimethoate, in order of appearance and according to the dose, from ataraxia to death ($n=27$).....68
2. Linear relationship between the time of appearance of the first symptoms after intoxication and the dose of dimethoate ingested by red-winged blackbirds ($y = 551.54 - 268.95 \log x$; $r^2 = 0.71$).....69
3. Linear relationship between the mortality rate (%) of red-winged blackbirds and the dose of dimethoate on a logarithmic scale ($y = -77.21 + 128.15x$; $r^2 = 0.92$).....70
4. Relationship between the duration of the symptoms of intoxication of red-winged blackbirds as a function of sublethal doses of dimethoate ($y = 145.87 + 462.84 \log x$).....72
5. Frequency distribution of red-winged blackbirds perch-hopping activity before and after ingestion of sublethal doses of dimethoate.....73
6. Duration of the effects of sublethal doses of dimethoate on red-winged blackbirds' daily activity level.....74

CHAPITRE 4

1. Description of the different places where external and internal transmitters were positioned on red-winged blackbirds during the experiments.....91
2. Impact of the position of the external transmitter on the variability in skin temperature (Ts) through time during the light phase.....92
3. Differences between body core and skin temperature (Tb-Ts) measured with an external transmitter positioned on the jugular vein (DNJ) and an internal transmitter inserted underneath the incision (BCI) or on the opposite side (BCO) of the abdominal cavity.....93
4. Daily cycle of body core (○) and skin (●) temperature of a european starling under constant ambient temperature (20 °C) and a 12:12 LD cycle (400 lux).....94
5. Linear relationship between body core and skin surface temperatures recorded on the european starling (Fig. 4) (A) during the dark phase ($y = -1.08 + 1.06x$; $r^2 = 0.92$; $F_{34} = 408.5$; $P = 0.00011$) and (B) during the light phase ($y = 9.35 + 0.79x$; $r^2 = 0.56$; $F_{28} = 12.7$; $P = 0.037$).....95
6. Impact of ambient temperature and body size on the body core temperature (Tb) and skin temperature (Ts).....96

CHAPITRE 5

1. Typical daily cycle of body temperature (°C) of European Starlings recorded before and after ingestion of dimethoate.....110

2.	Relationship between ambient temperature (°C) and the difference in time required to reach minimum overnight Ts (°C) recorded the night before and after pesticide ingestion. (A) 0 mg/kg, (B) 1.76 mg/kg, (C) 5.27 mg/kg and (D) 15.80 mg/kg dimethoate.	111
3.	Impact of dimethoate on the period of the temperature cycle. Values were expressed as variability around 24 hrs, measured on the day of treatment.	112
4.	Impact of dimethoate on the difference between the range in day-night Ts recorded the day after and before pesticide ingestion.	113
5.	Difference between the mean overnight Ts measured the day after and before pesticide ingestion.	114
6.	Relationship between brain AChE inhibition and the difference in range of day-night Ts recorded the day after and before pesticide ingestion.	115
7.	Relationship between the difference in mean overnight Ts recorded the day after and before pesticide ingestion and brain AChE inhibition.	116

CHAPITRE 6

1.	Impact of ambient temperature on daily variations in brain AChE activity of control brown-headed cowbirds (A) and birds exposed to dimethoate (B).	130
2.	Impact of ambient temperature on mean AChE activity of control (A) and treated (B) brown-headed cowbirds.	131
3.	Daily cycle of body temperature of brown-headed cowbirds exposed to dimethoate at ambient temperatures of 25 °C and 5 °C.	132

CHAPITRE 7

1. Impact of dimethoate on the body weight of rock doves in captivity.....146
2. Typical daily cycles of body temperature (t) and activity level (a) of a rock dove recorded before (A: day 8) and after (B: day 13) ingestion of a single dose of dimethoate.....147
3. Long-term effect of dimethoate on the variability of the period of the circadian cycle of (A) body temperature and (B) activity level around 24 hrs.....148
4. Long-term effect of dimethoate on the variability in time to reach minimum overnight (A) body temperature and (B) activity level.....149
5. Long-term impact of dimethoate on mean diurnal (A) body temperature and (B) activity level.....151
6. Long-term impact of dimethoate on mean overnight (A) body temperature and (B) activity level.....152
7. Long-term impact of dimethoate on the variation in (A) nocturnal body temperature and (B) activity level.....153

ANNEXE 1

1. Schéma de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase (A, B, C) et de l'hydrolyse d'un produit organophosphoré (le diméthoate) par l'acétylcholinestérase en trois étapes (D, E, F).....186

INTRODUCTION

1 LES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS

1.1 Historique

L'activité insecticide des composés organophosphorés (OPs) a été découverte en 1937 avec les travaux de Schrader, toutefois, leur utilisation commerciale ne s'est vraiment répandue que dans les années 50 (Eto 1974). Suite aux restrictions émises concernant l'utilisation des pesticides organochlorés, les OPs ont rapidement envahi le marché à l'échelle mondiale (Stickel 1974, Smith 1987) puisqu'ils sont moins persistants dans l'environnement et métabolisés plus rapidement par les homéothermes que les organochlorés (Cairns *et al.* 1991, Stickel 1974). Aujourd'hui, les OPs représentent le plus grand groupe d'insecticides connu et ils prédominent dans le contrôle des espèces nuisibles (Bardin *et al.* 1994, Gallo et Lawryk 1991). Ils sont utilisés dans une grande variété d'habitats tels que les milieux agricoles, les forêts, les milieux humides, les industries, les cultures maraîchères et les potagers (Packer 1975, Bardin *et al.* 1994).

Les pesticides représentent un moyen très efficace de lutter contre les espèces nuisibles. Par contre, ils ont aussi le potentiel de provoquer des effets toxiques chez les espèces non-visées (Grue *et al.* 1991). Les OPs ont été impliqués à plusieurs reprises dans des empoisonnements non-intentionnels d'oiseaux sauvages, et ce même s'ils étaient utilisés selon les normes recommandées (Grue *et al.* 1983, Smith 1987, Kendall *et al.* 1992, Mineau et Peakall 1987, Stanley et Fletcher 1981, Greig-Smith *et al.* 1990). De plus, des incidences de mortalité en masse de plusieurs espèces d'oiseaux causées par ces produits ont également été rapportées (Mendelssohn 1962, Mendelssohn et Paz 1977).

1.2 Mode d'action

Les OPs peuvent pénétrer dans le système par trois voies naturelles connues: par ingestion, par contact dermique et par inhalation (Gallo et Lawryk 1991). Les OPs inhibent l'activité hydrolytique des cholinestérases (ChEs), et plus particulièrement celle de l'acétylcholinestérase (AChE), en phosphorylant le site actif de l'enzyme (O'Brien 1967). Chez les vertébrés, l'AChE se retrouve dans le sang et dans les systèmes nerveux central et périphérique. Sa fonction principale est d'hydrolyser l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur essentiel à la transmission nerveuse des systèmes sympathique et parasympathique, et à la contraction des muscles squelettiques. Dans le cerveau, l'ACh est libérée à quelques endroits critiques, notamment à proximité de l'hypothalamus, région responsable entre autres du contrôle de la température corporelle et des rythmes de sécrétions hormonales (Vander *et al.* 1980, Gallo et Lawrik 1991, Meeter 1971, Clement 1993). Des fibres provenant du système nerveux central libèrent de l'ACh à proximité d'une autre fibre nerveuse ou d'un tissu. L'ACh se lie à son récepteur et induit une dépolarisation de la membrane post-synaptique, ce qui entraîne soit la libération d'un autre neurotransmetteur comme la norépinéphrine, soit l'excitation d'un tissu comme la contraction d'un muscle squelettique (Vander *et al.* 1980).

L'AChE est essentielle au bon fonctionnement du système nerveux. En hydrolysant l'ACh libérée dans la fente synaptique, elle libère les récepteurs post-synaptiques et permet à la membrane de se repolariser afin de pouvoir réagir à la prochaine stimulation (Gallo et Lawryk 1991). L'inhibition de l'AChE provoque une accumulation anormale d'ACh dans les tissus (Burgen et Hobbiger 1951). Les récepteurs étant saturés en ACh, la membrane demeure dépolarisée, ce qui a pour effet de stopper la transmission nerveuse dans la portion cholinergique du système nerveux (Cairns *et al.* 1991, Gallo et Lawryk 1991). De cette façon, l'inhibition de l'AChE empêche, entre autres, les muscles de se contracter, ce qui cause la paralysie et souvent la mort qui survient le plus souvent par asphyxie (Vander *et al.* 1980). Puisque l'AChE est un enzyme ubiquitaire chez les vertébrés et les invertébrés, son inhibition par les OPs représente une menace pour la plupart des animaux sauvages et domestiques, ainsi que pour l'homme (Rama et Jaga 1992, Al-Jaghbir *et al.* 1992).

1.3 Symptômes d'intoxication

Une intoxication aux OPs produit une multitude de signes et symptômes observables chez les individus affectés. Parmi la liste de tous ces symptômes, on compte la sudation, la salivation, l'hypophagie, l'ataraxie, l'ataxie, etc. Les OPs provoquent également des tremblements, des vomissements, des diarrhées, des crampes abdominales, des difficultés respiratoires, des troubles de vision, des convulsions, des faiblesses musculaires, de l'incoordination motrice, des paralysies partielles, etc. La mort résulte le plus souvent d'un arrêt respiratoire (Grue *et al.* 1991, Hudson *et al.* 1984).

1.4 Impact des OPs sur le comportement

L'effet général d'une exposition aux OPs sur le comportement est un malaise global qui se manifeste le plus souvent par une réduction d'un très grand nombre de comportements (Bignami *et al.* 1975). Les OPs induisent entre autres, une réduction du taux d'alimentation (Grue 1982, Costa et Murphy 1982, Kozar *et al.* 1976), de la vitesse d'apprentissage (Bowers *et al.* 1964, Geller *et al.* 1985) et de la capacité mémorielle (Beninger *et al.* 1989). Une diminution de la quantité de nourriture ingérée, une réduction du temps passé au vol et à la quête alimentaire, une baisse du nombre de chants et une augmentation du temps de perchage sont d'autres exemples des modifications du budget d'activité provoquées par les OPs chez les oiseaux (Hart 1993, Grue et Shipley 1981).

De plus, il semble exister un lien considérable entre le système cholinergique et l'élaboration du comportement d'agression chez les animaux. On a observé une hausse des agressions chez plusieurs espèces d'oiseaux intoxiqués aux OPs (McEwen et Brown 1966, DeRosa *et al.* 1976) alors que chez le campagnol, on a assisté à une diminution des comportements agressifs (Durba *et al.* 1989). Une augmentation ou une diminution des comportements agonistiques pourraient altérer significativement le succès reproducteur des animaux (Reis 1975).

Gallo et Lawryk (1991) ont rapporté une hyperactivité chez des rats contaminés à faible dose, ce qui a aussi été confirmé chez l'étourneau par Hart (1993). À des doses supérieures, en plus de remarquer une perturbation du niveau d'activité, on note souvent un désordre intestinal qui a pour effet de réduire la consommation en eau et en nourriture (Costa et Murphy 1982, Grue 1982). L'anorexie provoquée par les OPs amène souvent une perte de poids. En effet chez l'Étourneau on a observé des pertes de poids de 14% en 24 heures suite à l'ingestion d'un anticholinergique (Grue et Shipley 1984). Cet effet est tellement important et prévisible que la perte de poids est inversement proportionnelle au degré d'intoxication (Grue *et al.* 1991). Chez l'étourneau femelle, il a été montré que la perte de poids était liée à la réduction de l'activité alimentaire mais également à des modifications dans leur habileté à manipuler efficacement les aliments (Hart 1993, Fryday *et al.* 1994).

L'ensemble de ces effets sur le comportement contribue à affaiblir les individus et les rendre moins alertes face à d'éventuelles menaces compromettant ainsi leurs chances de survie ou leur reproduction. Ces impacts des OPs sur le comportement, bien que de plus en plus documentés (Mineau 1991, Grue et Shipley 1984, Hart 1993, Grue 1982), sont des impacts à long terme qui devraient être davantage considérés dans l'évaluation des pesticides afin de les rendre moins dangereuses pour les espèces non visées.

1.5 Impact des OPs sur les rythmes circadiens

La rythmicité circadienne est une propriété fondamentale des êtres vivants (Gwinner 1986, Harker 1957). De la simple cellule aux organismes les plus complexes, plusieurs fonctions suivent un cycle qui s'autoperpétue sur une période approximative de 24 heures, comme la sécrétion des corticostéroïdes, la pression sanguine, la température corporelle, l'organisation des activités journalières et la phase de sommeil. Les centres de contrôle des rythmes circadiens se situent dans le noyau suprachiasmatique, la glande pinéale et le complexe hypothalamique (Minors et Waterhouse 1986).

En général, les facteurs comme la température ambiante, l'intensité lumineuse (Swingland 1976), les facteurs sociaux (Marimuthu *et al.* 1981, Trajano et Menna-Barreto 1996) et les facteurs abiotiques cycliques comme le soleil, sont appelés Zeitgebers parce qu'ils ont un effet d'entraînement sur les rythmes endogènes de l'animal (Aschoff 1960, Aschoff 1979, Kabasawa et Ooka-Souda 1994, Geetha *et al.* 1996). Chacun des organes ayant un rythme endogène propre, l'individu doit organiser et réguler l'ensemble de ses rythmes endogènes. Cette régulation permet aux différents organes de fonctionner dans un bon ordre pour répondre aux besoins de l'individu. Un des rôles des rythmes circadiens est de préparer l'organisme aux différentes variations environnementales cycliques. Il est donc normal que l'organisme doive continuellement intégrer des informations exogènes pour réajuster ses différents cycles endogènes (Aschoff 1963, Aschoff 1966).

Il est reconnu que les rythmes circadiens endogènes sont extrêmement sensibles aux modifications environnementales (Aschoff 1979, Innocenti *et al.* 1994) puisque l'organisme doit intégrer les différents stimuli exogènes afin d'ajuster son rythme biologique aux différents cycles de son environnement. Il devient alors important de considérer que tout produit ou événement qui altère la capacité de régulation des rythmes (tel que les OPs) a une importance biologique certaine. De plus, par la sensibilité de ce système d'organisation et d'intégration des informations exogènes ou endogènes, il est alors fort possible que des agents chimiques qui perturbent un organe ou une fonction physiologique pourra perturber également les rythmes circadiens en général.

Le complexe hypothalamique qui est impliqué dans le contrôle des rythmes circadiens est innervé par des neurones cholinergiques. Par conséquent, l'ACh est aussi impliquée dans le contrôle des rythmes circadiens (Earnest et Turek 1983). Ainsi, les centres de contrôle des cycles sont susceptibles d'être affectés par des agents anticholinergiques. Par exemple, plusieurs fonctions endocrines cycliques comme la sécrétion d'enzymes digestives (Murphy 1966, Jovic 1974, Murphy 1969) ou d'hormones impliquées dans la reproduction (Libertun et McCann 1974, Ruiz de Galarreta *et al.* 1981, Rattner et Hoffman 1984) sont affectées par des agents anticholinergiques. Meck (1983) rapporte que deux groupes d'anticholinergiques, les carbamates et la physostigmine, accélèrent la mémorisation de nouvelles informations, ce qui entraîne une désynchronisation entre le

rythme de formation de la mémoire et l'horloge interne de l'animal. Les OPs comme le sarin perturbent aussi les électro-encéphalogrammes (EEG) et les phases "rapid eyes movement" (REM) du cycle de sommeil du singe et de l'humain (Karczmar 1984, Duffy *et al.* 1979). Dans certains cas, les EEGs d'humains exposés préalablement à un OP ont différé des EEGs des groupes témoins pendant plus d'une année (Duffy et Burchfiel 1980). Raslear et Kaufman (1983) ont montré qu'une seule injection de DFP (un OP) a dérégulé le rythme circadien d'activité chez le rat.

1.6 Influence de la température ambiante sur la toxicité des OPs

Depuis plusieurs décennies, il est connu que la température ambiante influence l'impact des drogues et des produits chimiques sur les homéothermes, incluant les humains (Farris et Griffith 1949, Kohn-Richards 1939, Weihe 1973, Clough 1982, Shemano et Nickerson 1958). La température ambiante affecte entre autres les effets physiologiques des pesticides organophosphorés. Une diminution du temps de survie aux températures froides (Marton *et al.* 1962), une augmentation de la toxicité aux extrêmes de température (Ahdaya *et al.* 1976), une augmentation de la mortalité aux températures froides et chaudes (Baetjer et Smith 1956) en sont de multiples exemples chez les mammifères.

Chez les oiseaux également, plusieurs études relatent des interactions entre le froid et la toxicité des OPs. Par exemple, l'ingestion de parathion amoindrit la tolérance au froid du Colin de Virginie (*Colinus virginianus*) (Rattner *et al.* 1982). Chez le canard mallard (*Anas platyrhynchos*) intoxiqué au téméphos, la mortalité est beaucoup plus élevée à des températures de 10-18°C qu'à 39-41°C (Fleming *et al.* 1985). De même, Rattner et Franson (1984) ont montré qu'une exposition au méthyl parathion était sublétales à 22°C, mais devenait létale à -5°C pour la crécerelle américaine (*Falco sparverius*). Dans le cas de la caille japonaise (*Coturnix japonica*), la dose létale médiane (DL₅₀) pour le parathion est jusqu'à deux fois moins élevée aux températures chaudes (37°C) et froides (4°C) qu'à une température de 26°C (Rattner *et al.* 1987).

Par ailleurs, des études récentes démontrent que la température environnementale agit sur le niveau d'inhibition de l'AChE cérébrale induite par les OPs (Maguire et Williams 1987a, Maguire et Williams 1987b, Rattner *et al.* 1987). Chez le Colin de Virginie, le froid entraîne une inhibition de l'AChE plus prononcée que chez les individus soumis à des températures plus chaudes alors que chez la caille japonaise l'activité de l'AChE cérébrale des oiseaux exposés à une température ambiante de 37°C est plus inhibée que celle des animaux exposés à 26°C et au froid (4°C). Chez l'Étourneau sansonnet, il a été démontré que l'inhibition de l'AChE était plus prononcée lorsque la température ambiante devenait un stress pour l'animal (températures chaude et froide) (McDuff 1995).

2 MESURE DES EFFETS INHIBITEURS DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS

2.1 Dosage de l'acétylcholinestérase cérébrale

L'AChE cérébrale, parce qu'elle est directement ciblée par le mode d'action des OPs (voir annexe 1), demeure aujourd'hui l'analyse biochimique la plus utilisée pour déterminer le degré d'exposition aux OPs. La demi-vie de l'AChE dépend de sa forme moléculaire, de sa localisation et du tissu impliqué et varie de 85 minutes à 20 jours (Toutant et Massoulié 1988). Sa régulation semble être génétique mais est aussi influencée par le degré de stimulation dans les muscles ou par les variations ioniques dans le système nerveux (revue: Toutant et Massoulié 1988).

Encore récemment, Tacha *et al.* (1994) et Yawetz *et al.* (1993) ont rapporté des inhibitions significatives de l'AChE cérébrale chez des espèces d'oiseaux exposés à des OPs utilisés en milieu naturel selon les normes recommandées. Parmi ces espèces, on compte la population de tourterelle blanche (*Zenaida asiatica*) (qui est actuellement en déclin) dont plusieurs individus présentent une inhibition sévère de l'AChE cérébrale (>50%) (Tacha *et al.* 1994). Ainsi, les animaux sauvages sont encore aujourd'hui fréquemment empoisonnés par des pesticides. Et s'ils ne trouvent pas la mort rapidement, leurs chances de survivre et de se reproduire peuvent être gravement affectées (Grue *et al.* 1991). Le danger que représente un OP pour les populations d'animaux sauvages dépend

de plusieurs facteurs: la toxicité du produit, l'endroit où il est appliqué par rapport à l'aire utilisée par les animaux, la quantité appliquée, la persistance du produit dans l'environnement et la bioaccumulation du produit dans la chaîne alimentaire (Smith 1987).

Le niveau d'inhibition de l'AChE cérébrale est couramment utilisé en laboratoire pour diagnostiquer une exposition et pour évaluer l'ampleur des impacts d'une intoxication aux OPs (Fairbrother et Bennett 1988, Hill 1988, Hill et Fleming 1982, Westlake *et al.* 1983). De façon générale, sous des conditions expérimentales constantes, le degré d'inhibition de l'AChE est proportionnel à la dose administrée (Satyadevan *et al.* 1993, Hahn *et al.* 1991, Maguire et Williams 1987a). Les études en laboratoire sur les oiseaux suggèrent qu'une inhibition de l'AChE cérébrale de 20 % est une indication que l'animal a été exposé à un anticholinergique. Une inhibition de l'AChE cérébrale de 50 % et plus indique que l'empoisonnement par un inhibiteur de ChE est la cause du décès (Ludke *et al.* 1975). Toutefois, l'activité de l'AChE cérébrale des oiseaux morts par suite d'une exposition aux OPs est souvent inhibé à plus de 50 %. À l'opposé, certaines études montrent qu'une inhibition de 50 % n'est pas nécessairement mortelle, du moins, en laboratoire (Ludke *et al.* 1975).

2.2 Dosage de l'acétylcholinestérase cérébrale: le revers de la médaille

La méthode du dosage de l'AChE pour évaluer le degré d'exposition aux OPs en milieu naturel comporte des limites qui l'empêche d'être appliquée facilement sur le terrain. Effectivement, dans des conditions naturelles, il est difficile de prédire le degré de toxicité des OPs à partir de tests effectués en laboratoire, car les modèles d'études ne tiennent pas compte de l'ensemble des variables environnementales. D'autre part, l'évaluation de l'impact des OPs par l'activité de l'AChE sur le terrain rencontre de nombreux obstacles qui rendent ardue l'interprétation des résultats: le succès de capture des individus, le prélèvement ainsi que la conservation des échantillons tissulaires et sanguins jusqu'au laboratoire, l'impossibilité de connaître le délai entre l'exposition et le prélèvement des échantillons cérébraux, etc.

Par ailleurs, il existe de très grandes variations journalières dans le niveau d'activité de l'AChE (Rattner *et al.* 1982, Thompson *et al.* 1988, Rattner et Fairbrother 1991). Cette variabilité est probablement due à la variation interindividuelle de la quantité d'enzymes (niveau de base) chez les animaux sains. Elle constitue une des principales difficultés rencontrées lorsqu'on utilise la mesure d'AChE cérébrale comme outil de diagnostic d'exposition aux OPs. À cause de cette variabilité, la limite pour admettre qu'un animal a été exposé à un OP est établie à 20 % d'inhibition de l'AChE cérébrale par rapport aux témoins (Ludke *et al.* 1975).

Une autre limitation de la méthode provient du fait que la comparaison de données d'inhibition de l'activité des cholinestérases cérébrales entre les laboratoires est très limitée (Mineau et Peakall 1987). La méthode la plus couramment utilisée pour déterminer le taux d'activité enzymatique de l'AChE est celle d'Ellman *et al.* (1961) telle que modifiée par Hill et Fleming (1982) (description en Annexe 2). Toutefois, la grande sensibilité de cette méthode de dosage de l'AChE à la moindre variation dans les différentes étapes de sa technique est en cause. Dans leur revue, Fairbrother *et al.* (1991) illustrent bien cela en décrivant toutes les sources d'erreur pouvant survenir lors de l'utilisation de cette méthode.

Le dosage de l'activité de l'AChE cérébrale comporte un autre désavantage majeur: il nécessite l'euthanasie des animaux pour effectuer des prélèvements cérébraux. De plus, jusqu'à maintenant, le niveau d'inhibition de l'AChE s'est avéré peu efficace pour prédire la nature et la durée des effets sur le comportement (Hart 1993). Pour toutes ces raisons, le Service Canadien de la Faune a entrepris des recherches visant à trouver des outils complémentaires qui nous renseigneraient sur l'état général des oiseaux suite à une intoxication aux OPs (Mineau, comm. pers.)

2.3 Utilisation des rythmes circadiens pour évaluer les impacts des OPs

La plupart des modifications des fonctions physiologiques provoquées par une exposition à des produits anticholinergiques sont difficiles à interpréter en termes de menace réelle

pour la survie ou la reproduction des individus. Nous avons constaté qu'il existe de nombreuses limitations à la méthode du dosage d'AChE mais, jusqu'à présent, cette méthode demeure l'outil le plus universel et le plus utilisé dans ce domaine. Il faut alors chercher des méthodes complémentaires qui permettront surtout un suivi à long terme autant en captivité qu'en milieu naturel des impacts des OPs chez les espèces non visées. Le suivi des rythmes circadiens peut être une solution envisagée pour compléter la batterie des techniques utilisées actuellement pour évaluer les impacts des anticholinergiques.

2.3.1 Hypothèse et objectif de travail

Par leur sensibilité, par le fait qu'ils reflètent l'intégration des informations endogènes et exogènes et ainsi, l'individu dans son ensemble, par le fait que leur centre de contrôle est directement affecté par des produits anticholinergiques, nous pensons que le suivi des rythmes circadiens pourrait s'avérer un outil sensible et prometteur pour évaluer les impacts des pesticides.

L'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence le potentiel des rythmes circadiens comme nouvel outil de suivi et de détection des impacts provoqués par les OPs. L'hypothèse de départ relié à cet objectif est que, par suite d'une exposition à un agent anticholinergique, il y a modification de certains paramètres, comme la période, la stabilité et l'amplitude, des rythmes circadiens de température corporelle et d'activité chez les oiseaux.

La classe aviaire constitue un groupe très intéressant pour ce type d'études: les oiseaux sont faciles à observer en milieu naturel, ils sont abondants et, fréquentant tous les types d'habitats, ils s'avèrent particulièrement susceptibles à l'exposition aux pesticides en milieu naturel (Godfrey 1986). De plus les oiseaux sont jusqu'à 20 fois plus sensibles aux OPs que les mammifères. L'absence ou le faible niveau en A-estérases dans le plasma sanguin des oiseaux (Brealey *et al.* 1980, Mackness *et al.* 1988) semble être le facteur majeur qui explique cette grande sensibilité (Machin *et al.* 1975, Brealey *et al.* 1980, Westlake *et al.* 1983, Walker et Mackness 1987). Également, la présence de certaines

espèces sous nos latitudes toute l'année et la facilité de les manipuler en laboratoire rend possible la réalisation de ce type d'étude.

3 TOXICITÉ DES PRODUITS UTILISÉS

3.1 Alpha-chloralose

L'alpha-chloralose est un produit utilisé comme répulsif d'oiseaux, comme anesthésiant pour les chiens et les chats et comme agent pour la capture et la manutention de plusieurs animaux sauvages (Pelfrene 1991). La formule empirique de l'alpha-chloralose est $C_8H_{11}Cl_3O_6$. Son principal métabolite est le chloral, qui lui est oxydé en acide trichloroacétique et réduit en trichloroéthanol. Ces deux derniers métabolites sont responsables des effets hypnotiques de l'alpha-chloralose (Butler 1949).

L'alpha-chloralose est disponible en poudre. Il est connu sous plusieurs noms communs ou marques commerciales: alpha-D-Glucochloralose, anhydroglucochloral, chloroalosane, glucochloral, Alphakil et Somio (Pelfrene 1991).

La DL_{50} de l'alpha-chloralose chez le rat et la souris se situe entre 300-400 mg/kg et entre 600-1000 mg/kg chez le chien (Cornwell 1969). Chez les oiseaux, on observe une DL_{50} de 75 mg/kg pour l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*), 32 mg/kg pour le Carouge à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*), 42 mg/kg pour la Tourterelle triste (*Zenaida macroura*) et 178 mg/kg pour le Pigeon biset (*Columba livia*) (Schafer 1972). Ces données indiquent nettement la plus grande toxicité de l'alpha-chloralose chez les oiseaux en comparaison des mammifères.

3.2 Diméthoate

Le diméthoate est un insecticide et un acaricide systémique qui a aussi une certaine activité de contact. Il est appliqué à une grande variété de cultures de céréales, de fruits, de noix et de légumes pour contrôler plusieurs espèces d'insectes, de mites et de pucerons (Spencer 1968, Smith 1987). L'utilisation majeure se fait sur les cultures de coton, de haricot, de pois, de luzerne et de pacanes (Smith 1987). Il a été utilisé pendant deux décennies sur les cultures de céréales dans les prairies canadiennes (ECA 1981).

Le diméthoate provoque une inhibition de l'AChE cérébrale qui est fonction de la dose (Satyadevan *et al.* 1993, Radvanyi *et al.* 1986). La formule empirique du diméthoate est $C_5H_{12}NO_3PS_2$ (Gallo et Lawryk 1991). Le métabolite primaire du diméthoate est le diméthoxon, ce dernier étant responsable de la toxicité du diméthoate (Hassan *et al.* 1969, Gallo et Lawryk 1991).

Il est disponible en poudre, en concentré émulsifiable, en granules et en poudre mouillable. Il est connu sous plusieurs noms communs ou marques commerciales: Cekuthoate, Cygon, Daphene, De-Fend, Demos L40, Devigon, Dimate 267, Dimethogen, Fosfamid, Fostion MM, Perfekthion, Rebelate, Rogodial, Rogor, Roxion, Trimethion (Smith 1987).

Le diméthoate présente une toxicité extrême chez les oiseaux comparativement à une toxicité modérée chez les mammifères (Schafer 1972). En effet la DL_{50} chez le rat se situe à 250 mg/kg, alors que chez les oiseaux on retrouve une DL_{50} de 32 mg/kg pour l'Étourneau sansonnet, 6,6 mg/kg pour le Carouge à épaulettes (Schafer 1972).

Dû à sa haute solubilité dans l'eau et sa bioconcentration faible, le diméthoate a une persistance environnementale relativement courte. Il est absorbé rapidement et sa demi-vie est estimée à environ 19 jours quand il est appliqué sur les oranges (Smith 1987).

Lorsqu'il est utilisé sur un sol à 1,1 kg/acre en concentré émulsifiable, la moitié de l'insecticide est disparue en deux à quatre jours (Smith 1987).

4 CHEMINEMENT

Les résultats présentés dans cette thèse ont été élaborés suite à des échanges avec GREBE inc, le Service Canadien de la Faune et Envirotel Inc. Sous la direction de GREBE inc., nous avons participé en 1991 à un projet d'évaluation des effets du chlorpyrifos, un OP, sur l'activité de l'AChE cérébrale du Merle d'Amérique, *Turdus migratorius* (Brunet et Cyr 1990a). Nous avons constaté d'importantes variations dans l'activité de l'AChE cérébrale entre les oiseaux avant et après l'exposition au pesticide. Ainsi, il est apparu clairement que l'AChE ne constituait pas un outil complet et infailible pour évaluer la toxicité des OPs sur le terrain. De plus, la toxicité du produit, en terme de mortalité, était influencée par les conditions environnementales (Brunet et Cyr 1990a).

Au même moment, nous avons entrepris une série d'expériences visant à déterminer si un mélange de deux anesthésiants, l'alpha-chloralose (anticholinergique) et le sécobarbital, pouvait être utilisé pour capturer des oiseaux. Dans un premier temps, nous avons établi les concentrations des deux produits qui maximisaient le succès de capture, soit le temps le plus court entre l'absorption des graines contaminées et la perte de conscience, et la période de sommeil la plus courte, tout en minimisant les risques de mortalité (Cyr et Brunet 1992).

Nous avons déjà démontré que les rythmes circadiens d'activité des oiseaux étaient sensibles à un changement d'environnement structural (Brunet *et al.* 1989) et aux manipulations par l'expérimentateur comme la pesée des oiseaux (Brunet et Cyr 1990b). Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse que les rythmes circadiens d'activité pouvaient être modifiés par l'utilisation du mélange d'alpha-chloralose et de sécobarbital comme anesthésiant lors de la capture. Dans l'étude qui constitue le premier chapitre de cette thèse, nous avons donc vérifié l'effet de ces produits sur les rythmes circadiens d'activité des oiseaux. L'hypothèse a été vérifiée et de plus, les rythmes se sont avérés

efficaces pour détecter des signes d'intoxication plusieurs jours après que les oiseaux aient repris connaissance (Brunet *et al.* 1996).

Ces résultats nous ont amenés à considérer que les rythmes circadiens pouvaient constituer un outil suffisamment sensible pour détecter les effets des agents anticholinergiques tels que les pesticides organophosphorés sur l'état de santé général des oiseaux. Nous avons choisi de vérifier cette possibilité en utilisant le diméthoate, un OP très répandu sur le marché mondial des pesticides commerciaux et domestiques. Cette étude constitue le second chapitre de cette thèse. Elle décrit les effets du diméthoate sur les rythmes d'activité de trois espèces d'oiseaux granivores. L'hypothèse de travail est qu'une seule exposition au diméthoate engendre des modifications dans les rythmes d'activité des oiseaux. Les différentes modifications survenues au niveau de plusieurs paramètres circadiens du rythme d'activité nous ont permis de conclure que les rythmes circadiens pouvaient effectivement être utilisés pour détecter des effets de longue durée provoqués par un OP chez différentes espèces d'oiseaux (Brunet et Cyr 1992).

Le fait d'établir que les rythmes circadiens peuvent nous renseigner sur la durée des effets physiologiques des OPs n'est qu'une première étape vers la mise au point d'une nouvelle technique pouvant peut-être, pallier au problème de l'AChE cérébrale comme outil d'évaluation de la toxicité des OPs. La relation entre l'amplitude et/ou la durée des effets sur les rythmes et la dose administrée doit également être démontrée. Au troisième chapitre, nous avons documenté en fonction de la dose, les effets du diméthoate et leur durée sur le comportement et les rythmes d'activité chez le Carouge à épaulettes. L'hypothèse de travail était qu'une exposition au diméthoate entraîne des modifications du comportement qui sont de plus courte durée que les modifications dans la quantité d'activité selon la dose utilisée. Une liste exhaustive des symptômes visuels d'une exposition au diméthoate, en fonction de la dose et en ordre d'apparition après l'absorption du pesticide a été établie. La mesure du taux d'activité des oiseaux s'est avérée un outil plus sensible que le suivi de l'apparition des symptômes pour estimer la durée de la période de récupération à une dose donnée (Brunet *et al.* 1997).

Les rythmes circadiens d'activité nous ont permis de mettre en évidence les effets à long terme d'un pesticide anticholinergique en laboratoire. Cependant, il est difficile de suivre les rythmes d'activité des oiseaux en milieu naturel. Les OPs provoquent une chute radicale de température corporelle (hypothermie) qui a été rapportée par plusieurs équipes de chercheurs (Kozar *et al.* 1976, Rattner *et al.* 1987, Rattner and Franson 1984, Brunet *et al.* 1994). Étant donné que la température corporelle est aussi influencée par une rythmicité circadienne, nous avons émis l'hypothèse que le suivi du rythme de la température corporelle pourrait nous permettre d'évaluer la toxicité des OPs sur le terrain, au même titre que les rythmes d'activité. Suite à cette réflexion, Envirotel inc. a été sollicité par le Service Canadien de la Faune pour mettre au point une méthode d'évaluation de la toxicité du chlorpyrifos sur le terrain par le suivi de la température corporelle des oiseaux (Brunet *et al.* 1992, Brunet *et al.* 1994). Ces travaux ont permis de constater que les mesures de température, enregistrées par un émetteur thermosensible de longue portée fixé sur les oiseaux, sont soumises aux fluctuations des conditions climatiques. De plus, ces émetteurs enregistrent la température dermique (Ts), une mesure qui diffère de la température corporelle interne (Tb) des individus. Nous avons alors entrepris de mettre au point les conditions optimales d'utilisation des émetteurs externes pour le suivi de la température corporelle des oiseaux. Cette étude constitue le quatrième chapitre de cette thèse. Dans cette étude, nous avons déterminé quel était le meilleur endroit pour localiser l'émetteur sur l'oiseau. Cet endroit devait être celui où Ts reproduit avec la plus grande précision les variations de Tb, c'est-à-dire, l'endroit où Ts est la moins influencée par les activités de l'oiseau et par les conditions environnementales.

Par la suite, cette technique a été utilisée avec succès dans notre laboratoire dans le cadre d'un projet de maîtrise qui a clairement démontré, en fonction de différentes températures ambiantes, l'impact du diméthoate sur une partie du rythme circadien de la température corporelle, c'est-à-dire sur la phase d'hypothermie observée suite à l'exposition au diméthoate (McDuff 1995). Au cinquième chapitre de la présente thèse, nous avons également utilisé avec succès la méthode du suivi de la température corporelle en démontrant l'impact du diméthoate sur le cycle entier de température corporelle dont l'hypothermie (étudiée par McDuff (1995)) ne représente que 20% des modifications du cycle. L'hypothèse de travail était qu'une exposition au diméthoate entraîne des perturbations du rythme circadien de la température corporelle qui varient en fonction de

la température environnementale chez l'Étourneau sansonnet. Toutefois, nous n'avons observé aucune relation entre l'ampleur des modifications du cycle de température corporelle et la température environnementale. Pourtant, cette relation entre la température ambiante et la toxicité d'un OP est rapportée fréquemment dans la littérature (Maguire et Williams 1987b, Rattner *et al.* 1982, Fleming *et al.* 1985, McDuff 1995). En général, l'ampleur de l'inhibition de l'AChE cérébrale est fonction de la température environnementale et de la dose (Maguire et Williams 1987a, Rattner *et al.* 1987). Si les perturbations des rythmes circadiens sont provoquées par l'inhibition de l'AChE dans la zone cérébrale de contrôle des rythmes ou ailleurs dans le système, alors les perturbations des rythmes devraient être parallèles au niveau d'AChE et ainsi être fonction de la température ambiante et de la dose. Afin de résoudre cette question, nous avons mesuré de façon simultanée l'inhibition de l'AChE cérébrale ainsi que le cycle de température corporelle chez des oiseaux exposés au diméthoate, en fonction de différentes températures environnementales. L'hypothèse de travail était qu'une exposition au diméthoate entraîne des modifications de la température corporelle et un degré d'inhibition qui diffèrent selon la température ambiante.

Jusqu'à présent, nous avons décrit les symptômes visuels d'une intoxication aux OPs survenant dans les premières 24 heures après l'exposition, de même que les effets à court terme sur l'activité de l'AChE cérébrale ainsi que sur les rythmes circadiens de température et d'activité. Nous avons également rapporté des effets à long terme du diméthoate sur le rythme d'activité des oiseaux mais les effets à long terme sur les paramètres du rythme circadien de température n'ont pas été évalués. Dans le dernier chapitre, nous nous attardons aux effets à long terme du diméthoate sur les rythmes d'activité et de température corporelle enregistrés simultanément. L'hypothèse de travail est qu'une seule exposition au diméthoate engendre des modifications dans les rythmes d'activité et de température corporelle qui sont encore observables après plusieurs jours.

CHAPITRE 1

L'IMPACT DE L'ALPHA-CHLORALOSE ET DU SÉCOBARBITAL SUR L'ALIMENTATION ET LES RYTHMES CIRCAIDIENS DU CAROUGE À ÉPAULETTES

Ce chapitre représente les premières expériences réalisées pour tenter d'élucider les effets à long terme d'un anesthésiant sur les rythmes circadiens. Cet anesthésiant est composé en l'occurrence d'un anticholinergique, l'alpha-chloralose, et d'un barbiturique, le sécobarbitol. L'hypothèse de travail est que l'utilisation du mélange d'alpha-chloralose et de sécobarbitol engendre des modifications dans les rythmes d'activité des oiseaux. Ces effets décrits ici sont alors les premières bases de recherche sur lesquelles est fondé l'ensemble des travaux de recherche présenté dans cette thèse.

RÉSUMÉ

Les drogues anesthésiantes comme l'alpha-chloralose et le sécobarbitol sont utilisées pour capturer les oiseaux. Les doses sont choisies de façon à minimiser les risques de mortalité et maximiser le rendement de capture. Cependant, nous disposons de peu d'informations sur la durée nécessaire au rétablissement complet des individus après qu'ils aient repris connaissance. Dans cette étude, nous avons utilisé les rythmes circadiens d'activité pour suivre les effets à long terme d'un mélange d'alpha-chloralose et de sécobarbitol sur des Carouges à épaulettes mâles adultes. Lors des expériences, les oiseaux étaient isolés dans des boîtes insonorisées pendant 30 jours. Ils ont ingéré l'alpha-chloralose et le sécobarbitol mélangés à du maïs concassé 3 ou 15 jours après le début de l'expérience, selon le cas. Le jour du traitement, les oiseaux ont réduit leur taux d'activité, incluant leur alimentation. Ces effets ont persisté pendant 22 jours pour les oiseaux traités le jour 3, comparativement à 8 jours pour les oiseaux traités le jour 15. De plus, la distribution journalière de leurs activités fut désorganisée et certains sont devenus apériodiques. Les oiseaux traités le jour 3 ont recouvré un rythme normal après deux semaines, comparativement à 9 jours pour les oiseaux traités le jour 15. Ces résultats indiquent que les rythmes circadiens peuvent

détecter des signes de perturbation plusieurs jours après que les oiseaux aient repris connaissance. Nous avons aussi déterminé qu'une période d'acclimatation de 15 jours dans la cage expérimentale serait préférable avant de débiter les tests d'intoxication, ceci afin d'éliminer l'impact d'un changement d'environnement sur les rythmes circadiens.

Reproduction de l'article publié sous le titre de:

BRUNET, R., N. CAZA., and A. CYR. 1996. Food intake and circadian rhythms of activity of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). A time-course study on the effects of alpha-chloralose and secobarbital. *Biological Rhythm Research* 27(2): 227-240.

Note: le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Nathalie Caza a réalisé une partie des expériences et des analyses dans le cadre d'une initiation à la recherche. Le Dr. André Cyr a participé à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Anesthetic drugs like alpha-chloralose and secobarbital are used to capture wild birds. The doses are usually chosen on the basis of low mortality rates and high capture success. However, little information is available on the time necessary for the birds to fully recover from the drugs' effects after they have regained consciousness. In this work, we used circadian rhythms of activities to study the long-term effects of a mixture of alpha-chloralose and secobarbital on adult male Red-winged Blackbirds. The birds were housed individually in sound-proof boxes for 30 days, during which they received alpha-chloralose and secobarbital mixed with corn, either on day 3 or on day 15. On the day of treatment, the birds experienced a significant decrease in activity level, including feeding activities, which lasted more than 22 days for the birds treated on day 3, compared to about 8 days for the birds treated on day 15. Moreover, typical circadian distribution of activity was lost and many birds became aperiodic. Two weeks were needed for the birds treated on day 3 to recover normal rhythms, compared to less than 9 days for those treated on day 15. These results indicate that circadian parameters can be used to detect after-effects of intoxication long after the birds have regained consciousness.

INTRODUCTION

Alpha-chloralose is an effective oral anesthetic that has been used to control populations of bird pests since 1942 (Daude, 1942). This drug was originally used in Europe for local control of harmful birds, such as Rock Doves (*Columba livia*) and House Sparrows (*Passer domesticus*), and for crop protection (Daude, 1942; Giban, 1947; Borg, 1955; Ridpath et al., 1961; Murton et al., 1963; Cornwell, 1966; Thearle, 1968, 1969a, 1969b). With increasing air traffic, the frequency of bird-aircraft collisions encouraged the poisoning of several bird species around airports (Caithness, 1968; Cyr, 1977). Other species have been immobilized with alpha-chloralose, namely Wild Turkeys (*Meleagris gallopavo*) (Williams, 1966; Williams et al., 1966), Canada Geese (*Branta canadensis*) (Crider and McDaniel, 1966, 1967), Starlings (*Sturnus vulgaris*) (Feare et al., 1981), Waterfowl (Woronecki et al., 1991), as well as larger animals like Western grey Kangaroos (*Macropus fuliginosus*) (Arnold et al., 1986). However, a fairly long time

elapses between drug ingestion and muscle paralysis, allowing the birds to travel a good distance away from the capture sites (Williams, 1966).

Capture success was considerably improved when alpha-chloralose was combined with secobarbital (Crider and McDaniel, 1967, 1968; Brunet and Cyr, 1992a). Secobarbital is a depressant of the central nervous system that has been administered in laboratories and clinics for purposes ranging from light tranquilization to general anesthesia (Wenger et al., 1986; Furuyama et al., 1989; Nahata et al., 1991; Giffard et al., 1993). Brunet and Cyr (1992a) systematically studied the effects of different proportions of alpha-chloralose and secobarbital on Red-winged Blackbird (*Agelaius phoeniceus*) behaviors in captivity. They have shown that the birds are immobilized more rapidly, and for a shorter period of time, with a mixture of the two drugs than with alpha-chloralose alone. Doses ranging between 0.02 and 0.03 mg/g of body mass of each drug are suggested to maximize capture success without endangering the birds' lives.

Although the anesthetic properties of alpha-chloralose and secobarbital are well known (Holzgrefe et al., 1987; Wenger, 1988; Reid et al., 1989; Lang et al., 1992), it has been ignored how long the birds' physiological functions are affected after they have regained consciousness. To investigate into this question, we used circadian rhythms of activities as general indicators of the birds' physiological responses to the drugs (Murdock, 1986; Kennedy et al., 1990; Chakrabarty et al., 1991). These rhythms originate in the central nervous system, in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and in the pineal gland (Enright, 1965; Rusak and Zucker, 1979), and they control many physiological functions (review: Aschoff, 1960; Youngki et al., 1980; Alleva, 1987; Nowicki and Ball, 1989; Refinetti, 1992). Our first goal was to evaluate the time lapse between ingestion of a mixture of alpha-chloralose and secobarbital and the recovery of normal rhythms. Because handling Red-winged Blackbirds is known to disturb their circadian rhythms for several days in captivity (Brunet et al., 1989), the drugs were not administered by handling but rather mixed with their food. Our second goal was to find out if intoxication too soon after their transfer to isolated boxes could generate artefacts due to their recent handling. We therefore intoxicated birds either 3 days or 15 days after handling and compared the rhythms of activities and behaviors between these two groups of birds. An untreated

group was included to study putative fluctuations in circadian rhythms not caused by intoxication.

MATERIALS AND METHODS

Red-winged Blackbirds were captured with mist nets in a marshy roost. They were kept in captivity in an indoor aviary for at least one month prior to experimentation, as recommended by the *Ad Hoc* committee of AOU (1988). During this period, food and vitaminized water were provided *ad libitum*. The diet was composed of 1 part of cracked corn, 1 part of mixed grain, and 1/2 part of growth grain (16% protein). Relative humidity was 45 ± 5 %, temperature 23.0 ± 0.5 °C and illumination on a 12:12 LD cycle.

A total of 45 adult males were weighed and placed individually in a cage within a sound proof box (1m x 1m x 1m) during the 30 days of experiment. Relative humidity was 47 ± 5 %, temperature 24.0 ± 0.5 °C and illumination constant at 11 ± 0.5 lux. This light intensity was chosen because Red-winged Blackbirds express more stable circadian rhythms of activity at 11 lux than at higher light intensities. In earlier works, we have shown that these conditions sustain similar organization and intensity of activities as higher light intensities do (Brunet, 1990; Gauthier, 1989). Air circulation was maintained with a flow of 25 l/sec (Brunet and Cyr, 1992b). Juveniles and young males were excluded because young birds are more sensitive to toxins (Hill and Camardese, 1981; Hudson et al., 1984). The experimental animals received 14 g of mixed grain, an amount that favours a regular food intake of about 7 g/day (Brunet and Cyr, pers. comm.). The food was provided at 8:00 am every day, which constitutes a weak Zeitgeber that adjusted the birds' activities to a period of 24 h at the onset of the experiment. Any modification in the period length would be due to the drugs. They were subdivided into three groups of 15 specimens: birds of Group A remained untreated (control group), birds of Group B were treated on day 3 and birds of Group C were treated on day 15. The treated birds received a mixture of alpha-chloralose and secobarbital prepared according to Brunet and Cyr (1992): anhydrous alpha-chloralose 0.020 mg/g body weight (10% β -isomer; Sigma Chemical Co.) and secobarbital 0.020 mg/g body weight (Eli Lilly and Company Ltd) were dissolved in propylene glycol (BDH). The solution was sprayed over the 14 g of grain

mixture in a concentration that provided the whole dose in 7 g, and then incubated at room temperature for 48 h to favour drug adhesion. The dose of drugs ingested was assumed to be proportional to the amount of grain ingested. Daily amounts of grain eaten were estimated by weighing the remainings every morning for each box. Behavioral informations were collected through a one-way window during 1 h after the corn was provided, and once every 3 h on the day of treatment.

Circadian parameters were monitored from the birds' perch hopping activity (activity level, daily distribution of activity and period length). Each cage was equiped with two perches, linked by a microswitch to an event recorder (Brunet, 1990). The daily activity level of each bird represented the mean number of perch-hoppings per hour (PH/h). Because perch utilization varied widely among birds, the daily activity level of each bird was expressed in percentage relative to the activity level recorded on the first day, taken as 100% PH/h. In the case of the daily distribution of activities, the activity level recorded each hour was expressed in percentage relative to the highest number of PH/h of the day. We supplemented these measurements with behavioral observations to verify that variations in activity levels following drug ingestion were not due to a change in perching tendency. Finally, period lengths were measured from the birds actograms. Mann-Withney U tests for small sample size were used to compare daily activity levels, period lengths and daily amounts of food ingested between the birds of the control and treated groups. Distributions of daily activity before and after drug ingestion were compared by the Chi-square contingency test. Body weights measured before and after the experiments were compared using the Wilcoxon paired-sample test (Zar, 1984).

RESULTS

The experiment was started with birds of similar body weights, with averages of 62.5 ± 3.5 g for group A (control), 62.4 ± 3.3 g for the birds intoxicated on day 3 (group B) and 58.8 ± 6.6 g for the birds intoxicated on day 15 (group C). Weight losses of approximately 10% were observed in all three groups after 30 days (Wilcoxon paired-

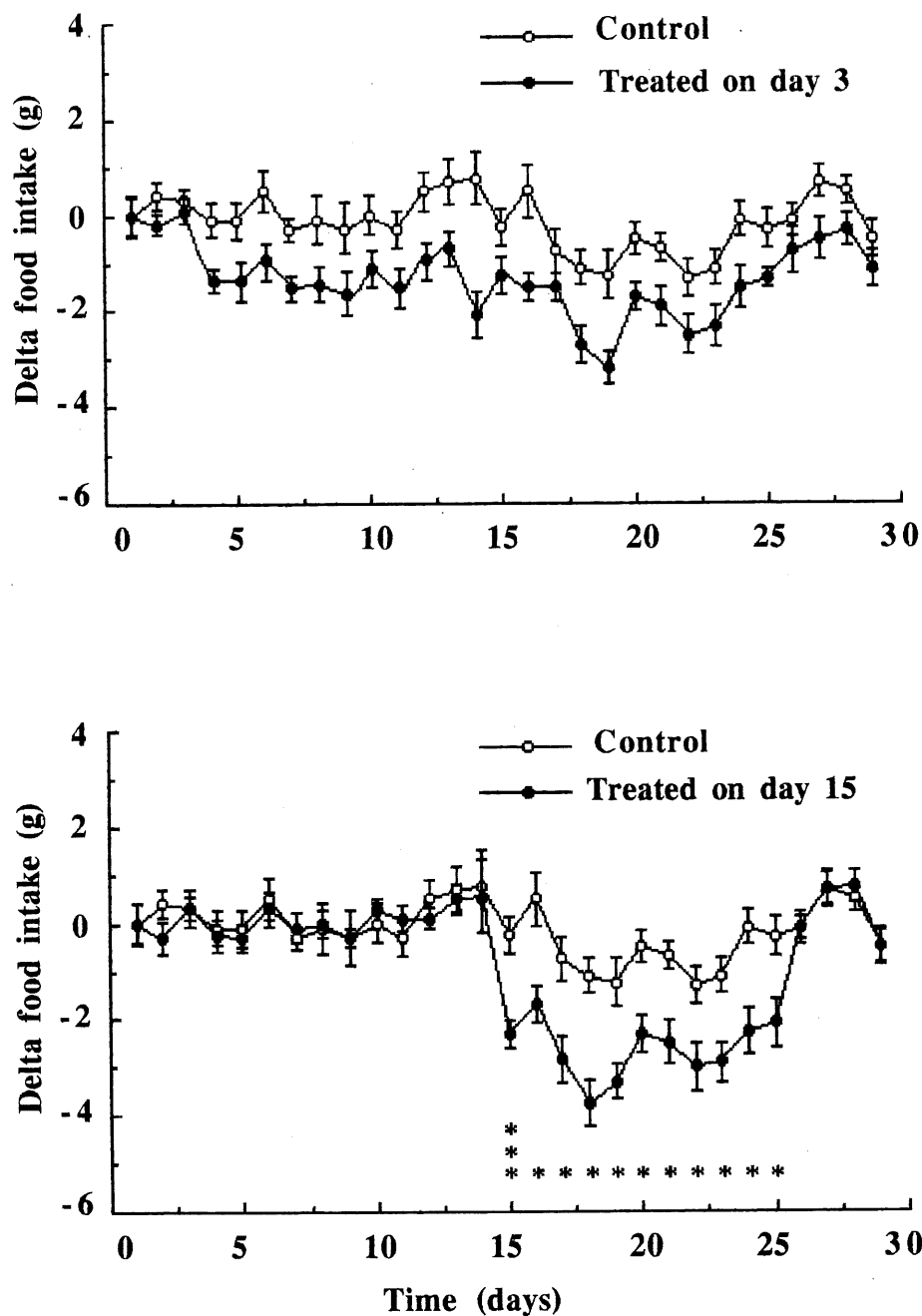


Figure 1. Comparison between the mean (\pm SEM) daily food uptakes of the control birds (n=15) and the birds intoxicated on day 3 (n=15) or 15 (n=15), over 30 days of experiment. Values were expressed as differences from 7 g. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

sample tests, group A: $T_{15} = 1$, $p < 0.0025$; group B: $T_{15} = 1$, $p < 0.005$; group C: $T_{15} = 13.5$, $p < 0.05$), with residual weights of 54.1 ± 7.2 g, 54.8 ± 5.3 g and 54.3 ± 7.9 g for groups A, B and C respectively. The three means for reduction were not significantly different, indicating that weight loss was not a consequence of drug absorption.

A daily survey of the birds' feeding habits demonstrated that ingestion of alpha-chloralose with secobarbital affected their food uptake. All control birds ingested an average of 7 g/day throughout the experiment, whereas those feeding on grain mixed with drugs reduced their food uptake. They were observed to slow down rapidly their feeding and grooming activities, and they were all unconscious within 10 min, remaining asleep during 2 ± 1 h (data not shown). Normal feeding intensity was not restored the next day. Although the differences were not statistically significant, the birds intoxicated on day 3 tended to reduce their daily food uptake until the end of the 30-day period (Fig. 1). The birds treated on day 15 responded more strongly to the drugs and consumed significantly less grain than the control birds during 11 days (day 15: $U_{(4,5)} = 24$; day 16: $U_{(5,5)} = 18$; day 17: $U_{(3,4)} = 12$; day 18: $U_{(4,5)} = 18$; day 19: $U_{(4,5)} = 18$; day 20: $U_{(4,5)} = 21$; day 21: $U_{(4,5)} = 21$; day 22: $U_{(4,5)} = 18$; day 23: $U_{(4,5)} = 21$; day 24: $U_{(4,5)} = 19$; day 25: $U_{(4,5)} = 23$). These results demonstrate that alpha-chloralose with secobarbital reduced the birds' food uptake long after they regained consciousness. Moreover, normal feeding was restored more rapidly when the birds were given 15 days to get acquainted to their new environment before intoxication took place.

The effects of alpha-chloralose plus secobarbital on the birds' daily activity were in agreement with behavioral observations. Before treatment, their activity level did not vary significantly with time, and was not different among the three groups (Fig. 2). The drugs significantly reduced the birds' activities. Mann-Whitney U tests revealed significant differences in activity level between the control birds and the birds intoxicated on day 3 ($U_{(15,15)} =$ day 3: 188; day 4: 186; day 5: 192; day 6: 187; day 7: 194; day 8: 195; day 9: 199; day 10: 191; day 11: 201; day 12: 189; day 13: 186; day 14: 195; day 15: 188; day 16: 192; day 17: 188; day 18: 193; day 19: 198; day 20: 195; day 21: 188; day 22: 189; day 23: 186; day 24: 171; day 25: 158) as well as between the control birds and the birds

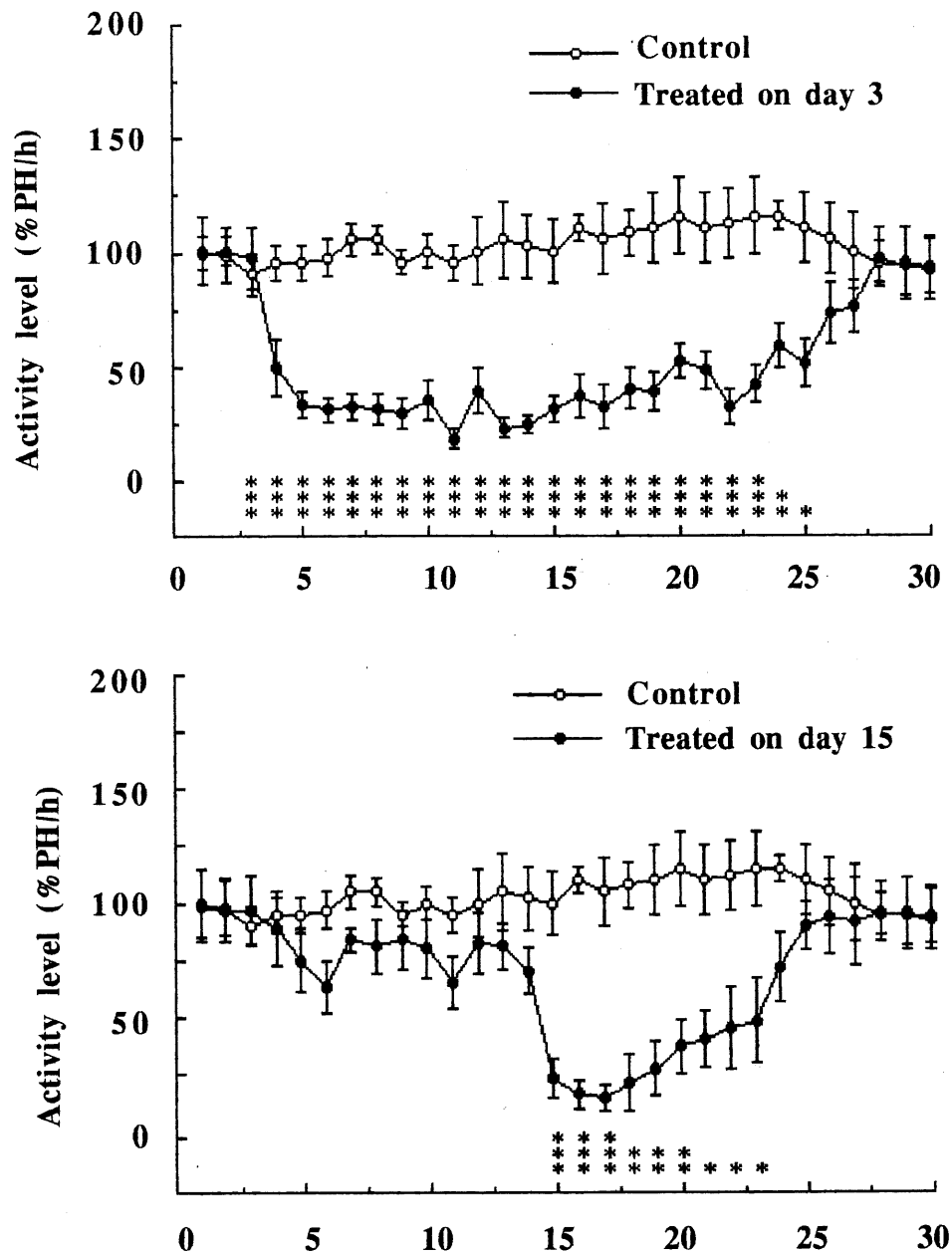


Figure 2. Comparison between the mean daily activity level (% number of perch hoppings/h or % PH/h) of the control and the treated birds. Each bird daily activity level was expressed in percent of the activity level recorded on the first day, taken as 100% PH/h. Values are mean \pm standard errors for each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

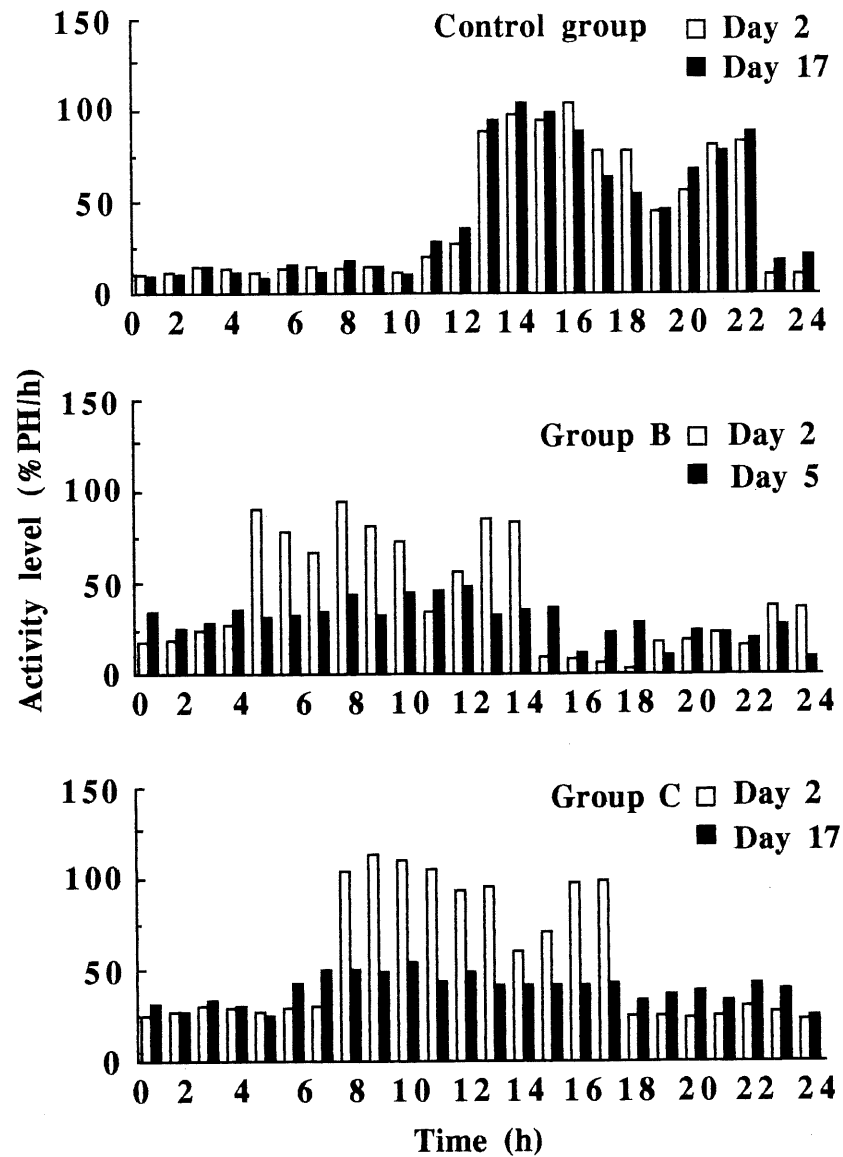


Figure 3. Typical distribution of the daily activities (% number of perch hoppings/h or %PH/h) of a control bird on days 2 and 17, of a treated bird of group B on days 2 and 5, and of a treated bird of group C on days 2 and 17, over 30 days of the experiment. The activity level recorded each hour was expressed in percentage relative to the highest number of PH/h of the day, taken as 100% PH/h.

intoxicated on day 15 ($U_{(15,15)} =$ day 15: 186; day 16: 187; day 17: 188; day 18: 193; day 19: 173; day 20: 170; day 21: 158; day 22: 163; day 23: 161). The birds that ingested the drugs on day 3 remained less active than the control birds during 23 days, whereas those on day 15 had completely restored their activities within 9 days.

The daily distribution of activities was also modified by alpha-chloralose plus secobarbital. Since the birds activities were not synchronized, we present an example of the activity distribution for one member of each of the three groups (Fig. 3). The control bird exhibited a bimodal pattern characterized by two peaks of activity, at the beginning and end of the high-activity phase. This pattern of the daily activity was also expressed by the birds of Groups B and C before treatment, but was lost after drug ingestion (Chi-square tests, Group B: $X^2_{23} = 185.76$, $P < 0.0001$; Group C: $X^2_{23} = 137.66$, $P < 0.0001$).

The circadian period of Red-winged Blackbirds was also strongly affected by alpha-chloralose and secobarbital. Figure 4 presents actograms of three birds from each group: the controls (A-C), birds treated on day 3 (D-F) and birds treated on day 15 (G-I). These actograms show that the control birds and the treated birds (before they received the drugs) maintained a period close to 24 h. Therefore, although they received their food ration every morning at 8:00, this disturbance was not sufficient to affect their period. On the contrary, this event could be responsible for maintaining their period length around 24 h. Alpha-chloralose plus secobarbital caused the birds to experience a phase shift and/or change in period length. These effects were so strong that 7 of the birds treated on day 3 and 4 of the birds treated on day 15 became aperiodic for at least two days, showing erratic phases of rest and activities. Examples of aperiodicity are presented in Figures 4H and 4I. The birds that did not lose periodicity adopted a period shorter than 24 h, an effect that lasted several days (Fig. 5). Mann-Whitney U tests revealed significant differences in period length between the control birds and the birds intoxicated on day 3 (Group B: $U =$ day 3: 171; day 4: 173; day 5: 170; day 6: 175; day 7: 172; day 8: 179; day 9: 176; day 10: 171; day 11: 170; day 12: 182; day 13: 180; day 14: 175), as well as between the control birds and the birds intoxicated on day 15 (Group C: $U =$ day 15: 159; day 16: 179; day 17: 182; day 20: 184; day 21: 187; day 22: 185; day 23: 172; day 24: 183; day 25: 180; day 26: 175). The period lengths of the birds treated on day 3 started to

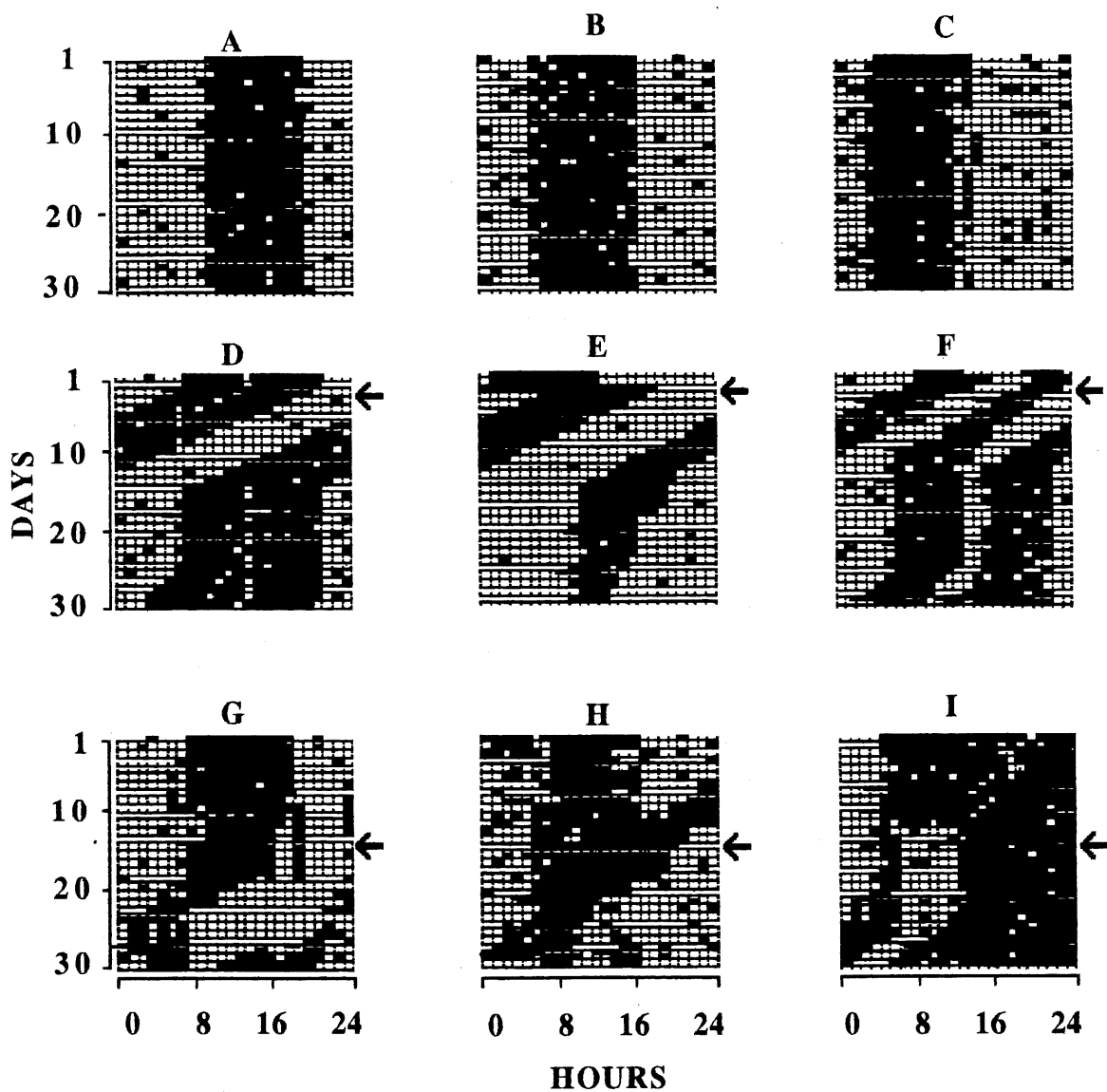


Figure 4. Actograms of perch-hopping activity of Red-winged blackbirds. Three examples are provided for control birds (A-C), birds treated on day 3 (D-F) and birds treated on day 15 (G-I). Actograms H and I illustrate examples of arrhythmicity occurring after drug ingestion. Each line represent 24 hours, activity bouts are indicated by dark lines, and rest by blanks. The arrows indicate the day of intoxication.

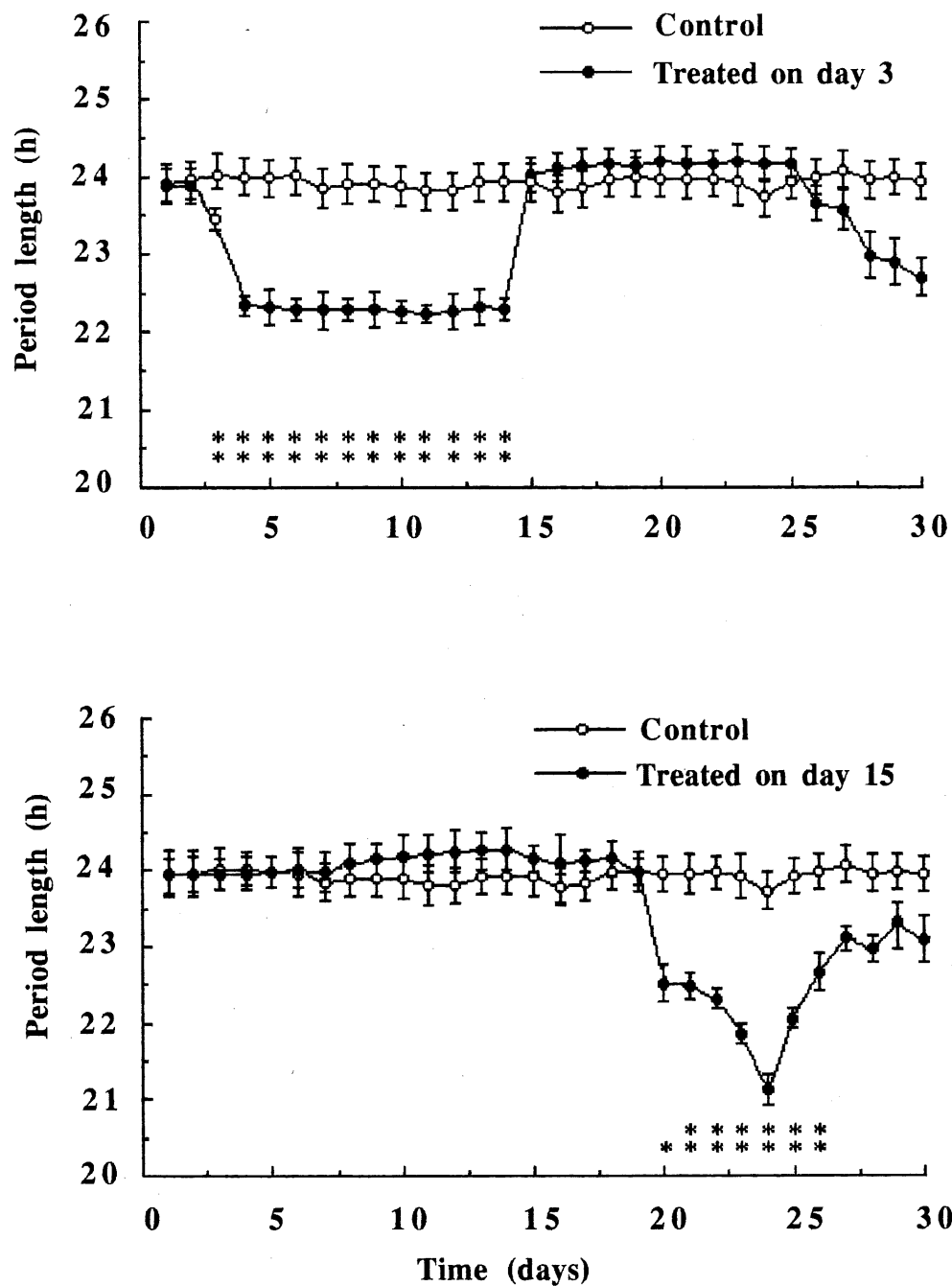


Figure 5. Comparison between the mean period lengths of control (n=15) and birds intoxicated on day 3 (n=8) or day 15 (n=11) over 30 days of experiment. Vertical bars represent standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

decrease on the day of treatment and remained around 22.5 h during 11 days, to decrease again 10 to 12 days after they had regained normal levels. The birds treated on day 15 responded to the drugs after 4 to 5 days, as also shown on their actogram (Fig.4G-I), and their period length varied considerably with time. These results demonstrate that the distribution of daily activities and the period length were disrupted during more than a week after drug absorption, and that the two groups tended to respond with different amplitudes.

DISCUSSION

We have established that circadian rhythms are strongly affected by the combination of alpha-chloralose and secobarbital. The day they were intoxicated, the birds of both treated groups reduced their activities by more than 40%. They were all unconscious within 10 min after feeding began, and remained asleep during 1 to 3 h. Signs of intoxication were still detected after the birds had regained consciousness. Two days after they ingested the drugs, the birds had not restored their usual distribution of daily activities, and many had become aperiodic. Moreover, they required more than 10 days to regain their normal feeding intensities, activity levels and period lengths. The half-life of secobarbital in the circulating blood is estimated around 29 h, and trace amounts are still present 4 days later (Clifford et al., 1974). The half-life of the anesthetic effect of alpha-chloralose is still unknown because we do not know whether this drug achieves its anesthetic action by itself, or after metabolic conversion to chloral hydrate (Holzgrefe et al., 1987). Nevertheless, alpha-chloralose considerably alters the pharmacokinetics of barbiturates (Mullane et al., 1984; Kenzora et al., 1984). By interfering with their redistribution to the lean body mass, alpha-chloralose prolongs their biological activity as effective anesthetics (Price, 1960; Hudson et al., 1983). These literature data are in agreement with the long term effects of the mixture of alpha-chloralose and secobarbital we presently measured for circadian rhythms.

The time lapse between their transfer to an isolated box and the drug ingestion strongly influenced the birds' responses to alpha-chloralose with secobarbital. The birds treated on

day 3 required a longer period of time to express normal feeding behaviors and activity levels than those treated on day 15. Moreover, differences in the amplitude of the birds' reactions were noticed between the two groups. An early treatment was associated with a less pronounced decrease in feeding intensity and a more frequent loss of periodicity. It is conceivable that the recent handling has interacted with their responses to the drugs. According to Brunet et al. (1989), Red-winged Blackbirds transferred to a new environment respond to this stressful experience by a modification of their circadian rhythms. In another study, Brunet and Cyr (1990) established correlations between the frequency at which Red-winged Blackbirds were manipulated and the reductions in body weight and activity levels. They noticed that the birds still showed signs of stress even 9 days after their last handling. In our experiment, the birds were weighed and moved from an aviary into a sound-proof box, passing from a social to an isolated condition. Consequently, the rhythms of the birds that absorbed the drugs only 3 days later were probably still perturbed by their recent handling and transfer into this new environment, thus interacting with the responses of their circadian rhythm system to alpha-chloralose and secobarbital. The fact that the results obtained with the group of birds intoxicated 15 days after handling differed from those treated earlier suggest that they were no longer affected by their handling and had become acquainted with their new environment.

As a conclusion, it has become evident that alpha-chloralose combined with secobarbital causes significant changes in Red-winged Blackbirds behaviors and circadian rhythms of activity, and that these modifications last longer than a week. Further investigations are required to explain why the birds treated on day 3 experienced a second phase of period length reduction 10 to 12 days after they had apparently recovered, and why the period length of those treated on day 15 only started to decrease 4 to 5 days after drug ingestion. Nevertheless, we have established that an intoxication performed too soon after their transfer into a new environment can influence the responses of their circadian organisation to the drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We wish to thank M. Picher for her constructive comments on this report.

REFERENCES

- AD HOC AOU COMMITTEE (1988): The use of wild birds in research. *Auk* 105: 1a-39a.
- ALLEVA, J.J. (1987): The biological clock and pineal gland: how they control seasonal fertility in the Golden Hamster. *Pineal Res. Rev.* 5: 95-131.
- ARNOLD, W.G., D. STEVEN, J. WEELDENBURG and E.O. BROWN (1986): The use of alpha-chloralose for the repeated capture of Western grey kangaroos, *Macropus fuliginosus*. *Aust. Wild. Res.* 13: 527-533.
- ASCHOFF, J. (1960): Exogenous and endogenous components of circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- BORG, K. (1955): Chloralose and its use for catching crows, gulls, pigeons etc. *Viltrevy-Jaktbiologisk Tidskrift* 1: 88-116.
- BRADY, J. (1974): The physiology of insect circadian rhythms. *Adv. Insect Physiol.* 10: 1-16.
- BRUNET, R. (1990): Relation entre les différents facteurs des rythmes circadiens et la hiérarchie sociale chez le Carouge à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). Masters thesis, University of Sherbrooke, Department of biologie, Sherbrooke, Canada.
- BRUNET, R. and A. CYR (1990): Effet du stress de la manipulation sur le comportement du Carouge à épaulettes. *J. Can. Zool.* 68: 1168-1173.
- BRUNET, R. and A. CYR (1992a): Anesthetization of captive Red-winged Blackbirds with mixtures of alpha-chloralose / secobarbital. *J. Wildl. Manage.* 56: 806-809.

- BRUNET, R. and A. CYR (1992b): The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. *Agriculture, Ecosystems Environ.* 41: 327-336.
- BRUNET, R., S. GAUTHIER and A. CYR (1989): Does visual structural environment influence the periodicity of circadian activity rhythms in Red-winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 20: 249-256.
- CAITHNESS, T.A. (1968): Poisoning gulls with alpha-chloralose near a New Zealand airfield. *J. Wildl. Manage.* 32: 279-286.
- CHAKRABORTY, S., P. THOMAS and D.J. SHERIDAN (1991): Arrhythmias, haemodynamic changes and extent of myocardial damage during coronary ligation in rabbits anaesthetized with halothane, alpha-chloralose and pentobarbitone. *Int. J. Cardiol.* 31: 9-14.
- CLIFFORD, J.M., J.H. COOKSON and P.E. WICKHAM (1974): Absorption and clearance of secobarbital, heptabarbital, methaqualone and ethinamate. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16: 376-389.
- CORNWELL, P.B. (1966): Control of house sparrows with alpha-chloralose. *Intern. Pest Control* 8: 10-13.
- CRIDER, E.D. and J.C. MCDANIEL (1966): Technique for capturing Canada Geese with alpha-chloralose. *Proc. Ann. Conf. S. E. Game and Fish Comm.* 20: 226-233.
- CRIDER, E.D. and J.C. MCDANIEL (1967): Alpha-chloralose used to capture Canada Geese. *J. Wildl. Manage.* 31: 258-264.
- CRIDER, E.D. and J.C. MCDANIEL (1968): Oral drugs used to capture Waterfowl. *Wildl. Res. Proj. Office* pp.156-161.
- CYR, J. (1977): Experiments with alpha-chloralose to control harmful birds. *Bird-Banding* 48: 125-137.
- DAUDE, J.L. (1942): Capture et destruction des corbeaux, pies et autres oiseaux nuisibles aux récoltes. *Bull. Acad. Med.* 126: 452-454.

- ENRIGHT, J.T. (1965): The search for rhythmicity in biological time-series. *J. Theor. Biol.* 8: 426-468.
- FEARE, C.J., A.J. ISAACSON, P.A. SHEPPARD and J.M. HOGAN (1981): Attempts to reduce starling (*Sturnus vulgaris*) damage at dairy farms. *Protection Ecol.* 3: 173-182.
- FURUYAMA, F., Y. ISHIDA, M. FURUYAMA, T. HASHITANI, Y. ISOBE, H. SATO, K. OHARA and H. NISHINO (1989): Thermal salivation in rats anesthetized with barbiturates, chloralose, urethane and ketamine. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C: 133-138.
- GAUTHIER, S. (1989): Rythmicité circadienne et mécanismes de synchronisation dans un groupe de Carouges à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). Ph.D.thesis, University of Sherbrooke, Department of biologie, Sherbrooke, Canada.
- GIBAN, J. (1947): La lutte contre les pies et les corbeaux. *Rev. Hort. Paris* 30: 433-435.
- GIFFARD, R.G., J.H. WEISS, R.A. SWANSON and D.W. CHOI (1993): Secobarbital attenuates excitotoxicity but potentiates oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cell culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 803-810.
- HILL, E.F. and M.B. CAMARDESE (1981): Subacute toxicity with young birds: Response in relation to age and intertest variability of LC50 estimates. In *Avian and Mammalian Wildlife Toxicology. Edited by D.W. Lamb and E.E. Kenaga.* 2nd Conference, ASTM STP 757, ASTM, Philadelphia, PA, p.41.
- HOLZGREFE, H.H., J.M. EVERITT and E.M. WRIGHT (1987): Alpha-chloralose as a canine anesthetic. *Lab. Anim. Sci.* 37: 587-595.
- HUDSON, R.J., D.R. STANSKI and P.G. BURCH (1983): Pharmacokinetics of methohexital and thiopental in surgical patients. *Anesthesiology* 59: 215-219.
- HUDSON, R.H., R.K. TUCKER and M.A. HAEGELE (1984): *Handbook of toxicology of Interior, Fish and Wildlife Service, Res. Publ. 153, Washington DC.*

- KENNEDY, M.J., G.L. GEBBER, S.M. BARMAN and B. KOCSIS (1990): Forebrain rhythm generators influence sympathetic activity in anesthetized cats. *Am. J. Physiol.* 28: R572-R578.
- KENZORA, J.L., J.E. PEREZ, S.R. BERGMANN and L.G. LANGE (1984): Effects of acetyl glyceryl ether of phosphorylcholine (platelet activating factor) on ventricular preload, afterload, and contractility in dogs. *J. Clin. Invest.* 74: 1193-1203.
- LANG, R.M., R.H. MARCUS, A. NEUMANN, D. JANZEN, D. HANSEN, A.M. FUJII and K.H. BORROW (1992): A time-course study of the effects of pentobarbital, fentanyl, and morphine chloralose on myocardial mechanics. *J. Appl. Physiol.* 73: 143-150.
- MULLANE, K.M., N. READ, J.A. SALMON and S. MONCADA. (1984): Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: Relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 510-522.
- MURDOCK, B.S. (1986): *Chronobiology*. Bolger Publications. U. S. A. pp. 1-19.
- MURTON, R.K., A.J. ISAACSON and N.J. Westwood (1963): The use of baits treated with alpha-chloralose to catch wood-pigeons. *Ann. Appl. Biol.* 52: 271-293.
- NAHATA, M.C., S. STRLING and R.C. EDWARDS (1991): Prolonged sedation associated with secobarbital in newborn infants receiving ventilatory support. *Am. J. Perinatol.* 8: 35-36.
- NOWICKI, S. and G.F. BALL (1989): Testosterone induction of song in photosensitive and photorefractory male sparrows. *Horm. Behav.* 23: 514-525.
- POSSIDENTE, B. and F.K. STEPHAN (1988): Circadian period in mice: Analysis of genetic and maternal contributions to inbred strain differences. *Behav. Genet.* 18: 109-117.
- PRICE, H.L. (1960): A dynamic concept of the distribution of thiopental in the human body. *Anesthesiology* 21: 40-45.

- REFINETTI, R. (1992): Analysis of the circadian rhythm of the body temperature. *Behav. Res. Meth. Introd. Comp.* 24: 28-36.
- REID, W.D., C. DAVIES, P.D. PARE and R.L. PARDY (1989): An effective combination of anesthetics for 6-h experimentation in the Golden Syrian hamster. *Lab. Anim.* 23: 156-162.
- RIDPATH, M.G., R.J.P. THEARLE, D. MCCOWAN and F.J.S. JONES (1961): Experiments on the value of stupefying and lethal substances in the control of harmful birds. *Ann. Appl. Biol.* 49: 77-101.
- RUSAK, B. and I. ZUCKER. (1979): Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59: 449-526.
- THEARLE, R.J.P. (1968): Urban Bird problem. In *The problem of birds as Pests. Edited by R.K. Murton and E.N. Wright. Institute of Biology Symposia No. 17, New York, Acad. Press.*
- THEARLE, R.J.P. (1969a): The use of stupefying baits to control birds. In *The human control of animal living in the wild. UFAW Symposium, 23rd January, Potters Bar. pp.10-16.*
- THEARLE, R.J.P. (1969b): Some problems involved in the use of stupefying baits to control birds. *Proc. Br. Insect. Fungic. Conf.* 5: 458-464.
- WENGER, G.R. (1988): Discriminative stimulus properties of the isomers of pentobarbital and secobarbital in pigeons. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 245: 389-393.
- WENGER, G.R., J.M. DONALD and H.C. CUNNY (1986): Stereoselective behavioral effects of the isomers of pentobarbital and secobarbital in the pigeon. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 237: 445-449.
- WILLIAMS, L.E.JR. (1966): Capturing wild turkeys with alpha-chloralose. *J. Wild. Manage.* 37: 69-72.

- WILLIAMS, L.E.JR., D.H. AUSTIN and J. PEOPLES (1966): Progress in capturing turkeys with drugs applied to baits. Proc. Ann. Conf. S.E. Assoc. Game and Fish Comm. 20: 219-226.
- WORONECKI, P., R.A. DOLBEER and T.W. SEAMANS (1991): Use of alpha-chloralose to remove waterfowl from nuisance and damage situations. Proc. Verteb. Pest Conf. 14: 343-349.
- YOUNGKI, K., M. PALLANSCH, F. CARENDENTE, G. REISSMAN, E. HALBERG and F. HALBERG (1980): Circadian and circannual aspects of the complement cascade: New and old results, differing in specificity. Chronobiologia 7: 189-204.
- ZAR, J.H. (1984): Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ USA. 718 p. 718.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. Les tests de chi-carré utilisés pour démontrer la perte du patron bimodal de la distribution journalière des activités chez les groupes B et C après l'intoxication ont été réalisés à partir de l'ensemble des individus des groupes B et C et non à partir des individus de la figure 3 seulement.

CHAPITRE 2

L'IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LES RYTHMES CIRCADIEUS DE TROIS ESPÈCES D'OISEAUX GRANIVORES

Le niveau d'acétylcholinestérase cérébrale est largement utilisé pour diagnostiquer l'exposition des oiseaux sauvages aux pesticides anticholinergiques sur le terrain (Hill et Fleming 1982, Westlake *et al.* 1983). Toutefois, la variabilité individuelle dans le niveau de base d'AChE enlève de la précision aux résultats puisque cette méthode nécessite la comparaison du niveau d'activité enzymatique des animaux entre eux (Brunet et Cyr 1990b, Mineau 1991, Brunet *et al.* 1992). Cette grande variabilité dans les résultats de l'AChE amène le Service Canadien de la Faune à chercher des techniques complémentaires qui nous informeraient sur les effets à long terme des OPs sur les espèces non visées, en milieu naturel ou en laboratoire (Mineau 1991). Les organophosphorés sont des insecticides agissant sur le système cholinergique. En réduisant le pouvoir d'hydrolyse des cholinestérases, ils provoquent une accumulation de l'acétylcholine aux synapses. Les OPs sont donc des agents anticholinergiques tout comme l'un des agents anesthésiants utilisés dans le chapitre 1 (alpha-chloralose). Dans ce chapitre, nous avons constaté les effets de l'anesthésiant sur les rythmes d'activité. Ici, nous avons exposé trois espèces d'oiseaux à un insecticide organophosphoré (diméthoate) dans le but de vérifier si les rythmes sont modifiés de façon similaire à l'anesthésiant expérimenté précédemment (chapitre 1). L'hypothèse de travail est qu'une seule exposition au diméthoate engendre des modifications dans les rythmes d'activité des oiseaux.

RÉSUMÉ

Le diméthoate est un pesticide couramment utilisé en agriculture. Cette étude décrit les effets du diméthoate sur trois espèces d'oiseaux granivores, le Bruant des prés (*Passerculus sandwichensis*), le Bruant chanteur (*Melospiza melodia*) et le Chardonneret jaune (*Carduelis tristis*). Les rythmes circadiens d'activité des oiseaux ont été enregistrés

pendant 30 jours dans des cages insonorisées. Le seizième jour, sept oiseaux de chaque espèce ont reçu une dose de 0,24 g de diméthoate / étalée sur 1 m² de graines. L'ingestion du diméthoate réduit de façon significative le taux moyen d'activité journalière des individus par rapport à des oiseaux contrôles ayant absorbé des graines non-contaminées. Ce pesticide perturbe aussi les rythmes circadiens des oiseaux pendant respectivement 10,0 jours, 11,5 jours et 9,0 jours pour le Bruant chanteur, le Bruant des prés et le Chardonneret jaune. De tels effets pourraient amoindrir leur capacité à se nourrir et les rendre plus vulnérables face à d'éventuels prédateurs.

Reproduction de l'article publié sous le titre de:

BRUNET, R. and A. CYR 1992. The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous birds species. Agriculture, Ecosystems and Environment 41: 327-336, 1992.

Note: le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Le Dr. André Cyr a participé à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Dimethoate is a currently sprayed organophosphate on farmlands. Its effects on endogenous rhythms of three farmland bird species, Savannah Sparrow (*Passerculus sandwichensis*), Song Sparrow (*Melospiza melodia*) and American Goldfinch (*Carduelis tristis*) were studied. Doses of 0.24 g of dimethoate m⁻² of seeds were given on the morning of Day 16 of the experiment for treated birds, and removed the next morning. Rhythmic parameters were collected in the form of perch hopping activity for a period of at least 30 days per bird. The treatment reduced significantly the mean daily activity levels of all the treated birds. It was found that dimethoate ingested orally causes temporary rhythm alterations, the mean recovery time from intoxication being 10.0 days, 11.5 days and 9.0 days for Song Sparrows, Savannah Sparrows and American Goldfinches, respectively. Such effects might become critical, if not fatal, in terms of the food finding ability of the animal and the birds would also be more vulnerable to predators.

INTRODUCTION

Since 1956, cygon, also labelled dimethoate, has been available as an organophosphate for use on farmlands, forests and gardens (Packer, 1975). This systemic insecticide controls a broad spectrum of species (Matsumara, 1975). The first signs of toxic exposure are usually caused by oral or cutaneous absorption and long-term effects are caused by chlorinated hydrocarbons (Caswell, 1979).

Organophosphates act on the metabolism by reducing the activity of the enzyme cholinesterase, permitting acetylcholine to accumulate in the nervous tissue (Friedman et al., 1987). According to O'Brien and Yamamoto (1970), dimethoate is rapidly eliminated from an organism exposed to a sublethal dose. However, birds continuously exposed to the insecticide may die when their cholinesterase activity decreased to 50% (Zinkl et al., 1981). Besides enzymatic effects, weight loss and lowered gonadal activity are also observed (Ghosh, 1986; Salem et al., 1988).

Circadian rhythms were recently used in pharmacological and medical studies to detect and measure drug as well as patho-physiological effects on the rhythms of patients (Pöhlmann, 1984; Bruguerolle et al., 1988; Montanini et al., 1988).

Because of their sensitivity, endogenous rhythms can be used to detect individual physiological modifications caused by external agents such as insecticides, toxic food as well as environmental changes. If dimethoate can alter rhythms, it would enable evaluation of the response thresholds and duration of toxicity effects. Thompson et al. (1988) observed daily reduction in rhythms after absorption of insecticides in Common Starlings (*Sturnus vulgaris*) with several reduction peaks of high intensity. Brunet and Cyr (1990) demonstrated that stress associated with animal handling affects rhythmic parameters.

Because dimethoate is currently used in agriculture, work was undertaken to study its effects on the rhythmic parameters of three bird species that inhabit fields and pastures, the Savannah Sparrow (*Passerculus sandwichensis*), the Song Sparrow (*Melospiza melodia*) and the American Goldfinch (*Carduelis tristis*). The aims of this study are to demonstrate the effects of dimethoate on the birds' endogenous rhythms and to evaluate the duration of their effects.

MATERIALS AND METHODS

American Goldfinches, Song Sparrows and Savannah Sparrows were captured with mist nets, and housed in large aviaries. They were fed *ad libitum* with mixed seeds commercially prepared for wild birds. Vitamins and minerals were added to drinking water.

The control birds (seven individuals per species) were observed during two periods of 15 days and the treated birds (seven individuals per species) were observed until the physiological effects of the drugs on the birds had disappeared.

In order to avoid any factors of entrainment (Zeitgebers) (Aschoff, 1960) which could modify the rhythms, birds were isolated in individual cages (24 cm x 30 cm x 45 cm) enclosed in sound-proof boxes (29 cm x 35 cm x 58 cm). The behaviors were observed through a one-way window. Each cage was equipped with two perches, the water level was controlled externally and enough food was given to last throughout the whole experiment without opening the door of the box, to avoid disturbance. The light intensity was 11 lux, the temperature 24.0 ± 0.5 °C, relative humidity 47.5 ± 5 % and air circulation maintained with a flow of 25 l s^{-1} .

The dose of dimethoate used was 0.24 g dissolved in acetone (Strombord, 1977), layered on seeds spread over an area of 1 m^2 . The birds' environment was not contaminated, only the seeds were sprayed with the insecticide. Seeds contaminated with dimethoate were made available on the morning of Day 16 of the experiment for treated birds, and removed the next morning. Control birds were offered fresh uncontaminated seeds in order to subject them to the same manipulations as experienced by the treated birds. Data were collected over a period of 30 days or more, depending on the individual time lag needed for full recovery from the effects of the insecticide.

Rhythmic parameters were collected in the form of perch hopping activity, via micro switches and electronically recorded with a McIntosh 512 K. The time of day and the perch number of each signal were recorded. Data were compiled and analysed every hour. The periodogram of Sokolove and Bushell (1978) was used to test the availability of the circadian rhythmicity and the periodogram of Enright (1965) was used to calculate the period length ($\pm 0.2 \text{ h}$) as well as the mean daily activity level. Individual weight variation between the first and the last days of the experiment was also recorded. Daily food consumption was estimated by dividing the total amount of seeds ingested by the number of days.

An analysis of variance was performed among the three species on the mean daily activity levels. Significant differences were further investigated using Scheffe's tests (Scherrer, 1984). The variation in body weight between the first and last days of the experiment was

compared among the species with the same statistical test. Values of $P < 0.05$ and $P < 0.01$ were considered significant and highly significant, respectively.

RESULTS

Periodograms of Sokolove and Bushell (1978) demonstrate that the activity rhythms of all the control birds remained unchanged throughout the 30 days of isolation, except in few cases on day 16 (Table 1). Even though the manipulations were done at the onset of the active phase, phase shifts varying in length from 20 min to close to 8 h were detected on that day (Figs. 1, 2 and 3). A second phase shift was again detected the following morning when the manipulation was repeated to simulate the removal of the contaminated food. These two periods of phase shift are also reported in the treated groups.

Periodograms of Sokolove and Bushell (1978) performed on the first 10 days show that the rhythm of each treated bird remained stable (Figs. 1, 2 and 3). This condition is essential for detecting the effect of dimethoate.

In general, the treated birds in all three species experienced a change in their period on Day 16 and many became aperiodic or the activity level was too small for evaluation of period (Table 2). All period changes are highly significant ($P < 0.01$) and differ by at least 0.5 h.

The mean daily activity level of the control birds remained stable throughout the experiment. During the pre-tests, the mean daily activity level of the treated birds did not change significantly. On Day 16 and following days, the mean daily activity levels of all the treated birds were significantly reduced (F ($P < 0.05$)) ranging from 3.4 to 207.5 perch hoppings h^{-1} . American Goldfinch No 6 was the only bird to show the same tendency in its activity without a statistical difference (Table 2). After 15 days of treatment, the activity level of all birds showed a tendency to return toward the initial levels (Fig. 4).

TABLE 1

Control bird measurements of period length (h), activity level (perch hops s⁻¹) and weight variation (g day⁻¹) for Song Sparrows, Savannah Sparrows and American Goldfinches at each stage of 15 days. None of the parameters compared were found to be significantly different between the stages.

Bird no.	Period (h)			Activity level			Weight change (g day ⁻¹)
	1 ¹	2	3	1	2	3	
<i>Song Sparrow</i>							
1	23.9	23.9		169.1	173.4		-1
2	23.9	23.9		332.2	342.5		-1
3	23.9	23.5		403.4	514.1		2
4	23.6	23.8		430.5	443.7		-1
5	24.7	24.6		211.5	193.2		1
6	23.6	23.3		240.1	199.1		2
7	23.6	23.4		123.9	135.3		1
<i>Savannah Sparrow</i>							
1	20.4	20.3		459.7	439.8		-2
2	23.8	23.7		130.3	139.9		-1
3	22.8	22.9		282.9	256.5		1
4	23.8	23.7		279.0	284.8		1
5	23.8	23.5		270.1	284.4		2
6	23.7	23.5		392.6	421.6		1
7	25.7	25.3		272.1	251.5		-2
<i>American Goldfinch</i>							
1	21.2	21.1		456.1	523.5		-1
2	20.3	20.3		654.1	658.3		-1
3	21.1	20.7		599.2	638.9		0
4	20.5	20.8		590.1	682.5		0
5	24.7	24.7		591.4	574.5		-1
6	21.2	21.4		220.1	203.0		0
7	23.6	23.2		177.9	179.5		-2

¹Refers to stage of the experiment.

TABLE 2

Treated bird measurements of period length (h), activity level (perch hops h⁻¹), recovery period (days), weight variation (g), mean amount of seeds ingested (g day⁻¹) and approximate doses of dimethoate ingested (mg kg⁻¹ body weight (BW)) for Song Sparrows, Savannah Sparrows, and American Goldfinches at each stage of 15 days. Many birds became aperiodic (AP), or the activity level was too small to evaluate the period at the second stage.

Bird no.	Period (h)			Activity level (perch hops h ⁻¹)			Recovery period (days)	Weight change (g)	Food ingested (g day ⁻¹)	Doses ingested (mg ⁻¹ kgBW)
	1 ¹	2	3	1	2	3				
<i>Song Sparrow</i>										
1	23.5*	24.5	24.0	134.4 *	27.2 *	150.7	10	-4	2.0	5.45
2	21.6*	AP *	20.9*	156.9 *	16.6 *	133.3	15	-4	2.0	5.65
3	23.8*	AP *	30.7*	237.7 *	2.3 *	136.7 *	10	-4	2.0	5.30
4	24.6*	AP *	31.9*	55.1 *	5.3 *	33.3 *	8	-3	3.0	7.01
5	23.3*	23.9		162.5 *	22.6		10+	-6	2.5	7.50
6	25.2*	24.5 *	33.9 *	110.4 *	12.7 *	144.4	7	-2	2.0	5.00
7	22.5*	AP		70.9 *	15.9		10+	-5	1.5	4.28
<i>Savannah Sparrow</i>										
1	23.8 *	AP *	30.5 *	116.9 *	1.7 *	237.8 *	10	-3	1.5	3.91
2	23.7 *	AP		20.5 *	6.3		10+	-6	1.5	4.50
3	24.2 *	AP *	23.4 *	125.9 *	69.7 *	151.5	11	-4	2.0	5.40
4	23.9 *	23.4		118.5 *	82.4		10+	-7	3.0	7.60
5	30.0 *	AP		218.4 *	40.7		10+	-6	2.0	6.00
6	32.2 *	AP *	22.9 *	245.3 *	69.8 *	167.1	14	-3	1.5	3.91
7	23.4 *	24.1 *	27.2*	151.9 *	60.8 *	108.7	11	-4	2.0	5.45
<i>American Goldfinch</i>										
1	24.6	24.6	24.6	471.5 *	66.56 *	457.5	9	-1	2.0	6.30
2	31.0 *	AP		47.4 *	9.97		10+	-5	2.0	6.70
3	23.4 *	23.9		244.6 *	46.02		10+	-5	2.0	6.90
4	24.4 *	AP	AP *	21.4 *	0.27 *	15.4	10	-3	2.5	4.44
5	22.9 *	AP *	23.4 *	9.2 *	4.43 *	10.1	11	-3	1.0	3.33
6	24.1 *	26.5 *	32.9 *	120.8	47.49	125.1	6	-3	2.5	4.71
7	22.7 *	24.2	23.8*	101.5*	38.17	55.9	20+	-6	1.5	6.00

¹Refers to stage of the experiment. * P < 0.05.

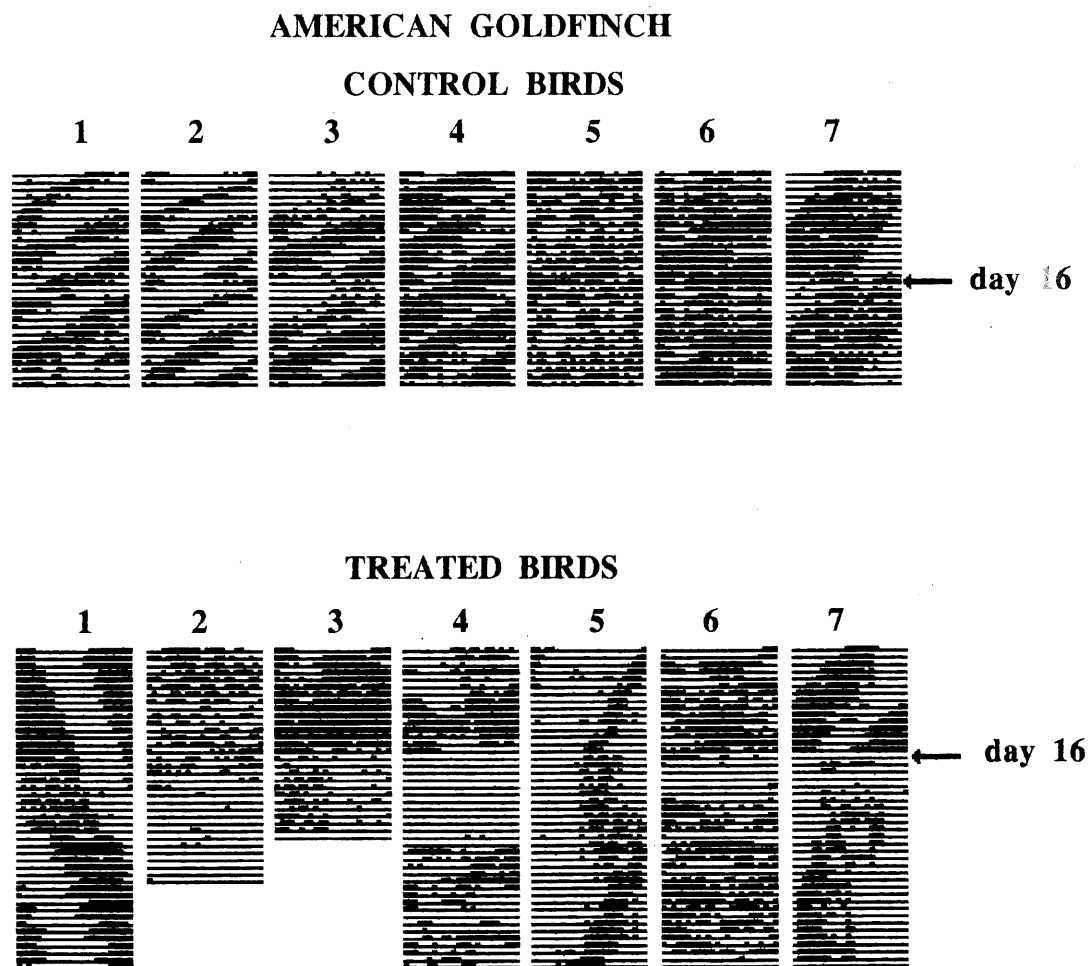


Fig. 1. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated American Goldfinches. Activity bouts are indicated by dark lines and the blanks indicate resting spells. The arrows indicate the day the pesticide was made available to the treated birds.

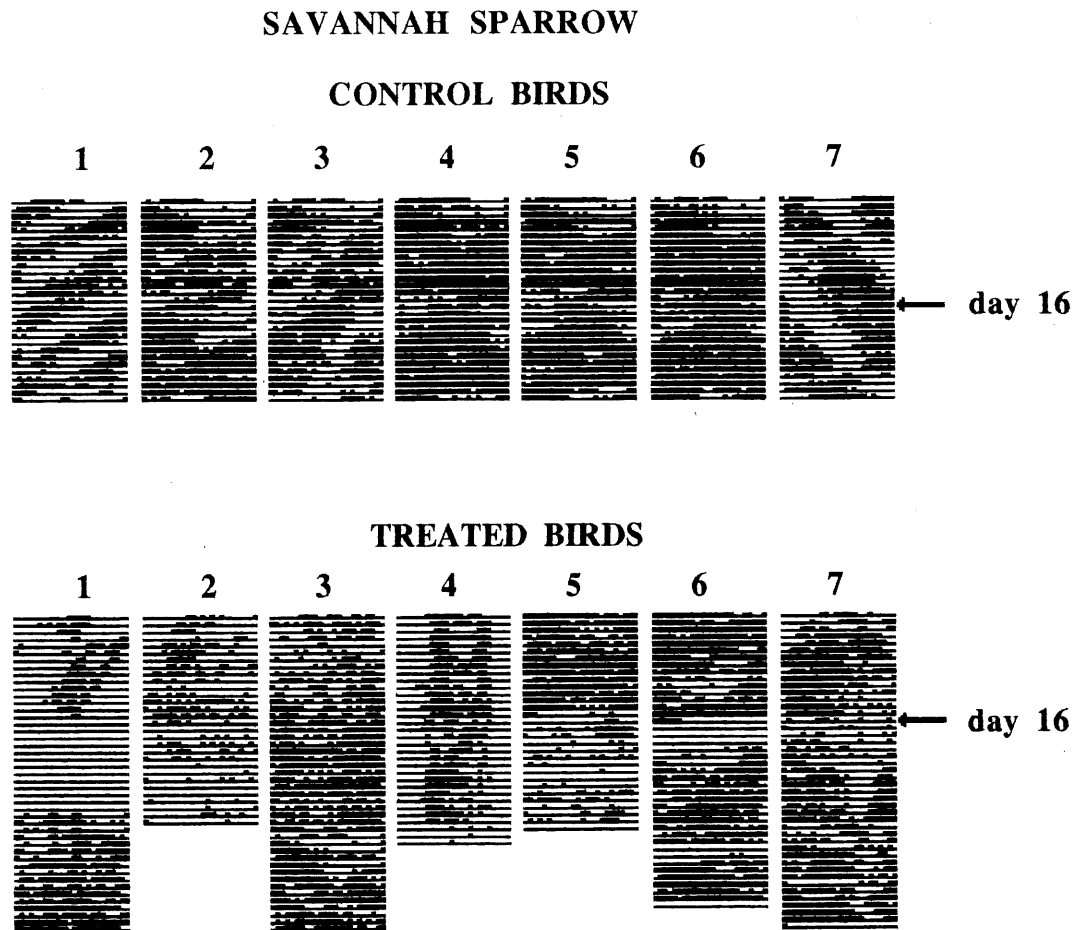


Fig. 2. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated Savannah Sparrows. Activity bouts are indicated by dark lines and the blanks indicate resting spells. The arrows indicate the day the pesticide was made available to the treated birds.

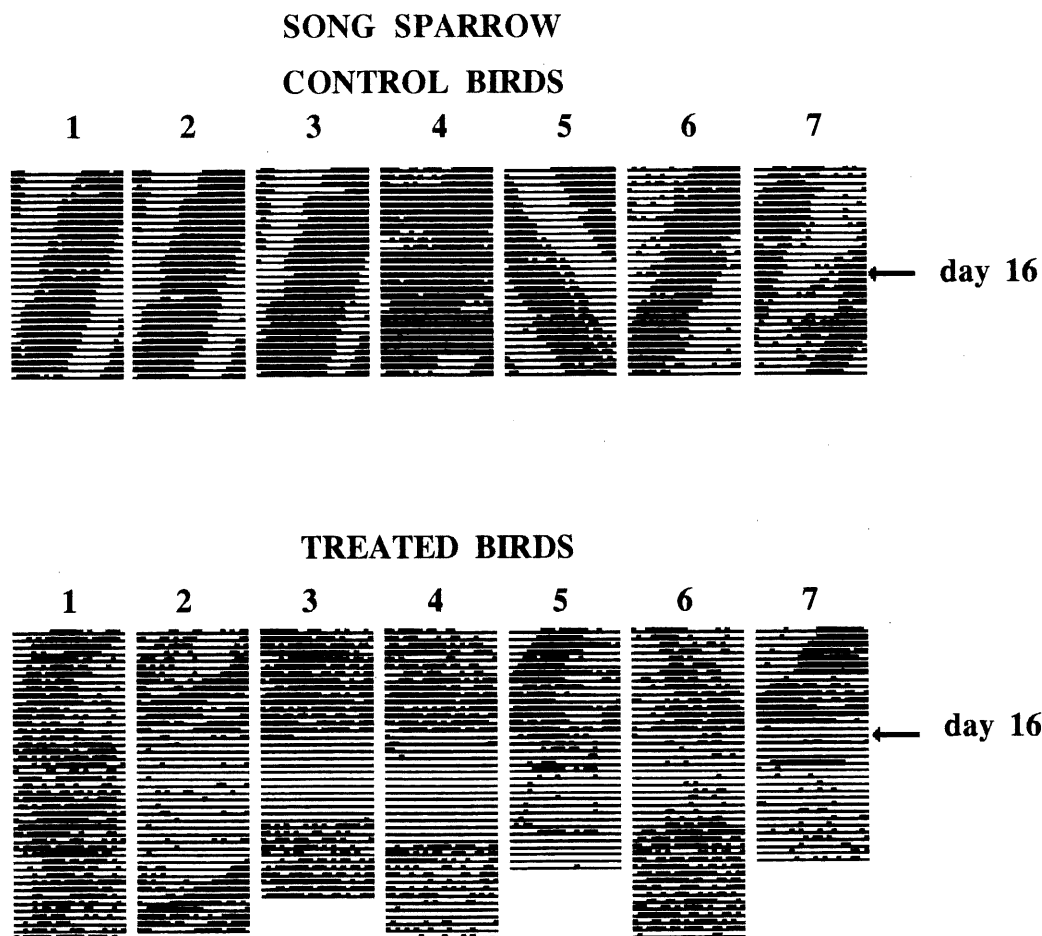


Fig. 3. Perch-hopping activity of the seven control and seven treated Song Sparrows. Activity bouts are indicated by dark lines and the blanks indicate resting spells. The arrows indicate the day the pesticide was made available to the treated birds.

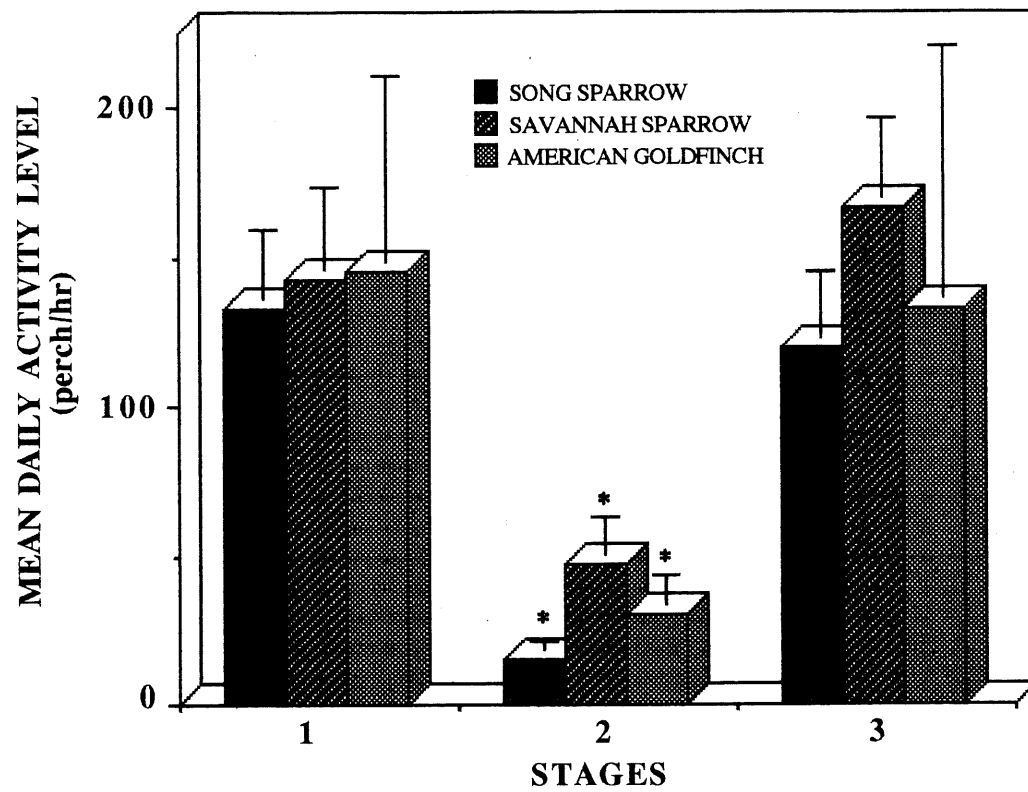


Fig. 4. Mean daily activity level of the treated birds measured as the mean number of perch triggerings per hour ($g \pm SD$) for the three bird species at each stage of 15 days. All birds were significantly less active during stage 2 ($P < 0.05$).

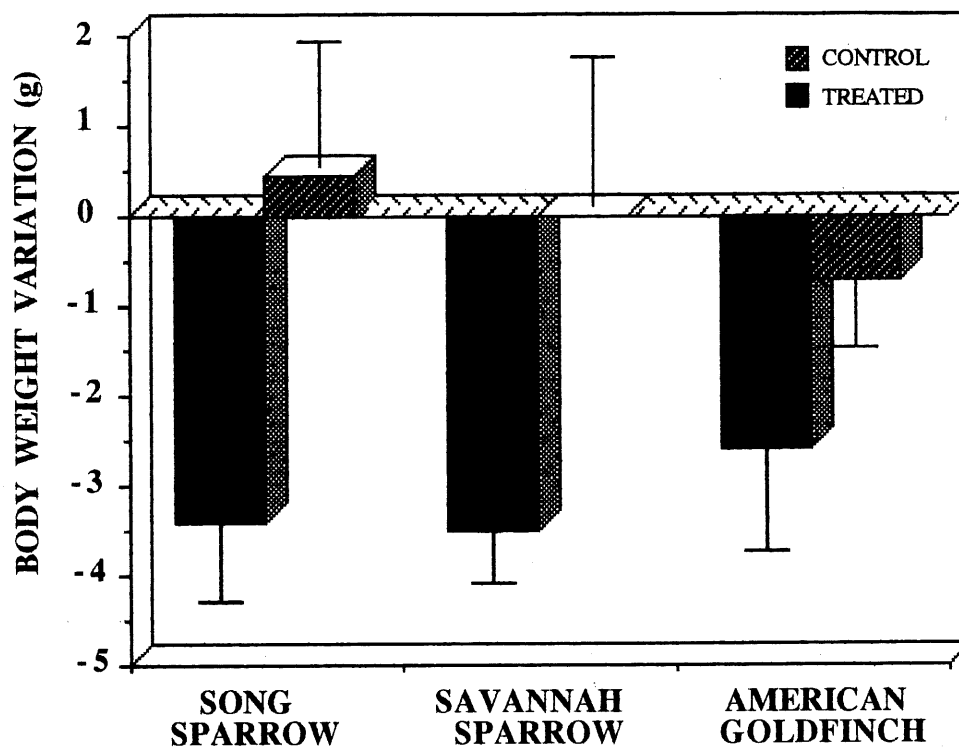


Fig. 5. Mean body weight variation ($g \pm SD$) between the first and the last days of the experiment of the treated and control birds. The treated birds of the first two species lost significantly more weight than their control counterparts ($P < 0.05$).

A few birds died following the treatment, excluding them from recovery time evaluations. The mean recovery time from intoxication for the Song Sparrows is 10.0 days, for the Savannah sparrows 11.5 days and for the American Goldfinches 9.0 days (Table 2).

The last parameters to be recorded were the weight of the birds on the first and the last days of the experiment, and the mean daily amount of food ingested. The control Song Sparrow gained an average of 0.43 g and the treated ones lost 3.4 g ($P < 0.05$, $U_{\text{calc}} = 35$). The untreated Savannah Sparrows maintained a constant body weight while the treated group lost an average of 2.6 g ($P < 0.05$, $U_{\text{calc}} = 28$). The control American Goldfinches lost 0.71 g, which is not significantly different from the 2.6 g lost by the treated birds (Fig. 5). These results are not related to the amount of food ingested because all three species ate on average the same amount of seeds per kilogram body weight: the Song Sparrow ate on average $2.14 \pm 0.48 \text{ g day}^{-1}$, the Savannah Sparrow $1.93 \pm 0.53 \text{ g day}^{-1}$ and the American Goldfinch $1.93 \pm 0.53 \text{ g day}^{-1}$ (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

The results indicate that dimethoate ingested orally causes temporary rhythm alterations in all three bird species. The period change cannot be attributed to stress associated with the food transfer because the control birds did not express a change in their period except for some phase shifts which can be related to the food switch on Day 16. Even though the distribution of activity was not modified, in contrast to the findings of Gauthier and Cyr (1990), many treated birds became aperiodic or their activity level became too low to be measured (Table 2). This in itself implies a change in the activity distribution. This reaction from the administration of dimethoate is only temporary as the birds recovered their periodicity after an average of 10 days, depending on the species. This might be interpreted as a return to the normal condition, even if the activity rhythm they adopt after the treatment is different from the one expressed before the treatment. In fact, Pittendrigh and Daan (1976) demonstrated that events experienced by an animal before the expression of a circadian rhythm influence its rhythm. Consequently, the treatment in itself modifies the birds' previous experiences, and, by doing so, causes a change in the rhythm of the birds.

All treated birds decreased their activity levels after dimethoate ingestion. The lower level of activity after the treatment is predictable given the nature of dimethoate. Organophosphates inhibit the activity of cholinesterase, from which follows an accumulation of acetylcholine in the nervous tissues, initiating muscle cramps (Friedman et al., 1987). The birds seem to begin to excrete the insecticide quite rapidly (O'Brien and Yamamoto, 1970). Even though no blood samples were collected in the present study, the slow recovery in activity level back to the normal state does not necessarily parallel the gradual disappearance of dimethoate in the bloodstream. Full recovery of the activity level implies that all factors inimical to the survival of the bird have disappeared.

The recovery time ranged between 6 and 15 days. Some individuals and species seem to eliminate the dimethoate more rapidly than others. American Goldfinches recover more rapidly than Song Sparrows which in turn recover more rapidly than Savannah Sparrows. This trend does not seem to be associated with the amount of food ingested, but may reflect the physiological capacities of each species to eliminate the insecticide. The loss of weight observed cannot be a result of decreased feeding or hyperactivity because neither of these were observed.

For an animal that has ingested insecticides, an impaired ability to find food might become critical, if not fatal, should the physiological effects remain for several days. Under such conditions, birds would also be more vulnerable to predators. These considerations illustrate the effects of dimethoate on non-target species. For an insecticide to be safe, non-target animals should not suffer any physiological impairments, or at the very least, its effect should not last long enough for the animal to die from hunger or to be killed under unusual conditions by a predator.

Even if the change in periodicity only indicates whether or not the bird has been intoxicated, monitoring the activity level allows measurement of the duration of the physiological impact of dimethoate.

Further studies are required to measure the influence of dimethoate ingestion on the daily food consumption of individual birds, i.e. to determine whether the birds eat less when intoxicated.

REFERENCES

Aschoff, J., 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 25: 11-28.

Bruguerolle, B., Pray, M., Douyllier, C. and Dorfman, P., 1988. Are there circadian and circannual variations in acute toxicity of phenobarbital in mice? Fundam. Clin. Pharmacol., 2: 301-304R.

Brunet, R. and Cyr, A., 1990. Effet du stress de la manipulation sur le comportement des carouges à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). J. Can. Zool., 68: 1168-1173.

Caswell, R.L., 1979. Pesticide handbook-entoma. The Entomological Society of America, College Park, MD.

Enright, J.T., 1965. The search for rhythmicity in biological time-series. J. Theor. Biol., 8: 426-468.

Friedman, J., Dison, M., Hanji, V. and Egyed, M.N., 1987. Mass intoxication in pellets caused by an organophosphorus insecticide. Interdiscip. Sci. Rev.J. Vet. Med., 43: 215-216.

Gauthier, S. and Cyr, A., 1990. Facilitation sociale sous un cycle de lumière-obscurité et sous des conditions constantes de luminosité chez le Carouge à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). Can. J. Zool., 68: 451-456.

Ghosh, T.K., 1986. Comparative toxicogenic evaluation of two commonly used pesticides, Ekalux (EC 25) and Rogor (Dimethoate) on the ovarian recrudescence in a teleost, *Sarotherodon mossambicus*. Uttar Pradesh, J. Zool., 6: 224-232.

Matsumara, F., 1975. Toxicology of Insecticides. Plenum, New York, 503 pp.

Montanini, V., Simoni, M., Chiossi, G., Baraghini, G.F., Valardo, A., Baraldi, E. and Marrama, P., 1988. Age-related changes in plasma dehydroepiandrosterone sulphate, cortisol, testosterone and free testosterone circadian rhythms in adult men. *Horm. Res.*, 29: 1-6.

O'Brien, R.D. and Yamamoto, I., 1970. *Biochemical toxicology of insecticides*. Academic Press, New York, 218 pp.

Packer, K., 1975. *Nanogen Index. A Dictionary of Pesticides and Chemical Pollutants*. Nanogens International, Freedom, CA, 256 pp.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S., 1976. A functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.*, 106: 223-252.

Pöllmann, L., 1984. Chronobiological considerations of aspirin and indomethacin. *Ann. Rev. Chronopharmacol.*, 1: 349-352.

Salem, M.H., Abo-Elezz, Z., Abd-Allah, G.A., Hassan, G.A. and Shaker, N., 1988. Effect of organophosphorus (Dimethoate) and pyrethroid (Deltamethrin) pesticides on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health Part B, Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 23: 279-290.

Scherrer, B., 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin, Chicoutimi, Québec, Canada, 850 pp.

Sokolove, P.G. and Bushell, W.N., 1978. The chi-square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72: 131-158.

Stromborg, K.L., 1977. Seed treatment effects on pheasant reproduction at sublethal doses. *J. Wildl. Manage.*, 41: 632-642.

Thompson, H.M., Walker, C.H. and Hardy, A.R., 1988. Avian esterases as indicators of exposure to insecticides: The factor of diurnal variation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 4-11.

Zinkl, J.G., Roberts, R.B., Shea, P.J. and Lasmanis, J., 1981. Toxicity of acephate and methamidophos to Dark-eyed Juncos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10: 185-192.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. Les oiseaux sont gardés en volière pendant une période minimale de 1 mois avant le début des expériences, à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, une humidité relative de $55 \pm 5\%$ et sous une photopériode de 12:12 (L:N). On leur fournit de la nourriture *ad libitum* composée de moulée laitière (16% de protéines), maïs concassé, mélange pour oiseaux sauvages et nourriture pour chatons Purina Kittenchow® dans une proportion de 2: 1: 1: 0,5. Par la suite, les oiseaux sont placés dans des cages isolées 10 jours avant le début de l'expérience, et ce dans les mêmes conditions que celles qui prévalent au cours de l'expérimentation. La nourriture est contenue dans une mangeoire remplie au jour 1 de l'expérience. Au jour 16, la mangeoire est vidée pour n'y laisser que 20 g de nourriture. Au jour 17, une estimation de la nourriture ingérée est effectuée en mesurant la quantité de nourriture (g) non-consommée des 20 g fournis la veille, puis la mangeoire est emplie à nouveau. L'expérience se fait en lumière constante et l'alimentation des oiseaux, lorsqu'elle a lieu, se fait à 8:00 h AM et ce peu importe l'heure circadienne de l'oiseau.
2. Les Chardonnerets jaunes nos 2 et 3 sont morts avant la fin des 30 jours qu'a duré l'expérience, de même que les Bruants des prés nos 2, 4, 5 et 6 et les Bruants chanteurs nos 3, 5 et 7.
3. À la figure 5 chaque espèce est représentée par 7 oiseaux témoins et 7 oiseaux traités.
4. Dans la discussion, l'expression «all factors inimical to the survival» signifie: tous les facteurs altérant son comportement et probablement même les facteurs pouvant altérer sa survie.

CHAPITRE 3

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LE COMPORTEMENT ET LE TAUX D'ACTIVITÉ DU CAROUGE À ÉPAULETTES (*AGELAIUS PHOENICEUS*)

Le diméthoate est un pesticide de la classe des organophosphorés qui est couramment utilisé sur les fermes et les propriétés privées. Ils représentent un moyen très efficace de lutte contre les espèces considérées nuisibles. Par contre, une fois qu'ils sont répandus dans l'environnement, ils ont aussi le potentiel de provoquer des effets toxiques chez les espèces non visées (Grue *et al.* 1991). Les OPs ont été, à plusieurs reprises, impliqués dans les empoisonnements non intentionnels d'oiseaux sauvages de plusieurs espèces (Stanley et Fletcher 1981, Grue *et al.* 1983, Smith 1987, Mineau et Peakall 1987, Greig-Smith *et al.* 1990, Kendall *et al.* 1992). Jusqu'à maintenant, nos résultats ont démontré des perturbations du rythme circadien d'activité chez des oiseaux exposés aux anticholinergiques dont le diméthoate (chapitre 2). Toutefois la période de réduction de l'activité suite à une exposition à un OP est mal connue dans la littérature. Les travaux se sont surtout concentrés à décrire ce qui est réduit dans l'activité, comme le budget d'activité (Grue et Shipley 1981), le temps de vol (Hart 1993), le chant (Peakall et Bart 1983, Grue et Shipley 1981), les activités de locomotion (Fibiger *et al.* 1971), etc. À notre connaissance, seuls les travaux de Raslear et Kaufman (1983) montrent que des paramètres circadiens sont désorganisés au delà du temps que dure la période de réduction du taux d'activité chez le rat. Dans cet article deux points sont évalués, d'une part, les effets sous-létaux du diméthoate sur le comportement, l'ordre d'apparition des symptômes, leur durée et d'autre part, les effets sous-létaux sur le taux d'activité et leur durée. On a constaté que les effets sur le comportement sont de très courte durée alors que la durée des effets sur l'activité est plus longue selon la dose d'exposition. Le taux d'activité pourrait très bien être un outil permettant de détecter une exposition à un OP, tant en laboratoire que sur le terrain, mais également, un outil pour déterminer le temps de récupération et de réadaptation suite à une exposition à un OP chez les espèces non visées.

RÉSUMÉ

En milieu naturel, plusieurs espèces non visées incluant les oiseaux sont empoisonnées par les OPs tels que le diméthoate. Alors que les causes de décès ont fait l'objet de nombreuses études, les effets des doses sous-létales sont peu connus. Dans cette étude, nous avons établi la liste des symptômes d'intoxication des Carouges à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*) exposés à des doses de diméthoate variant entre 0 et 1000 mg/kg poids frais (PF). Des doses ≥ 2 mg/kg PF causent l'ataraxie, suivie de la pilorection et de la déshydratation (défécation et diarrhée). Des troubles musculaires et des complications respiratoires apparaissent à des doses ≥ 3 mg/kg PF. Les premiers cas de paralysie musculaire et de mortalité surviennent avec 5 mg/kg PF, et tous les oiseaux qui ont ingéré des doses supérieures à 28 mg/kg PF sont décédés. La dose médiane létale (DL₅₀) est estimée à 9.9 mg/kg PF. Les symptômes d'intoxication persistent entre 1,5 et 12,5 hrs. Par contre, le taux d'activité des oiseaux demeure perturbé pendant plusieurs jours par des doses inférieures à 6,7 mg/kg PF. Des doses $\geq 1,34$ mg/kg PF causent une diminution de 68 à 73% du taux d'activité, alors que des doses $\leq 1,34$ mg/kg PF causent une augmentation de 100% du taux d'activité. Ces résultats suggèrent que les symptômes d'intoxication peuvent s'avérer utiles pour déterminer le degré d'intoxication, alors que le taux d'activité des oiseaux est un outil plus sensible pour estimer la durée de la période de récupération.

Reproduction de l'article publié sous le titre de:

BRUNET, R., C. GIRARD and A. CYR. 1997. Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. Agriculture, Ecosystems and Environment. sous presse.

Note: le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Carole Girard a également participé certaines expériences et aux analyses dans le cadre d'une initiation à la recherche. Le Dr. André Cyr ainsi que Carole Girard ont participé à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Non-target wildlife are frequently exposed to organophosphate pesticides such as dimethoate. While the causes of mortality have been reviewed, much less is known of the potential danger of sublethal exposures to these pesticides. In this work, the impact of lethal and sublethal doses of dimethoate on red-winged blackbirds was investigated using two different approaches: visual symptoms of intoxication and fluctuations in daily activity level. A series of symptoms was recorded in order of appearance with oral doses of dimethoate ranging from 0 to 1000 mg/kg BW. Doses ≥ 2 mg/kg BW induced ataraxia, followed by pilorection and dehydration (defecation and diarrhea). Neuromuscular disfunctions and breathing complications appeared at 3 mg/kg BW. Muscle paralysis and death were first observed with 5 mg/kg BW, and all birds that ingested doses superior to 28 mg/kg died. LD₅₀ was estimated at 9.9 mg/kg BW. Signs of intoxication lasted from 1.5 to 12.5 hours. In contrast, the birds' activity level was affected during several days with doses lower than 6.7 mg/kg BW. Two opposite responses were observed: doses ≥ 1.34 mg/kg BW initiated a 68 to 73% decrease in activity level, whereas doses ≤ 1.34 mg/kg BW initiated a 2-fold increase in activity level. These results suggest that the symptoms of intoxication may be useful to assess the degree of intoxication, and that the birds activity level is a more sensitive tool to estimate the time necessary for complete recovery.

INTRODUCTION

With increasing restrictions on the use of organochlorine compounds in the environment, organophosphates (OPs) have become the most commonly used pesticides in many parts of the world (Smith, 1987). However, the use of OPs in or near wildlife habitats has been responsible for inadvertent poisoning of large numbers of wild animals. Among them, dimethoate (o,o-dimethyl-s-(methylcarbamoylmethyl) phosphorodithioate) has been used since 1956 (Packer, 1975) on cultures of fruits, vegetables, grain and fodder (Spencer, 1982). The potential danger of dimethoate to non-target species has been reported in fishes (Gill and Pant, 1987; Kumar, 1989), birds (Bakre and Rajasekaran, 1989) and mammals (Schafer, 1972). Birds were shown to be more sensitive to OPs than rodents (Schafer,

1972; Anderson et al., 1977), and rodents to be more sensitive than fishes (Wallace and Herzberg, 1988).

Dimethoate is known to cause many biochemical and physiological stresses in animals including reductions in reproductive hormones level (Donovan et al., 1979), electroencephalogram modifications (Duffy and Burchfiel, 1980), liver and spleen weight losses (Shaker et al., 1988), impairment of the exchanges of sister chromatids (Gomez-Arroyo et al., 1987), an increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (Khattab et al., 1986) and an inhibition of acetylcholinesterase (AChE) (Hill and Flemming, 1982; Taylor, 1990). Measurements of AChE activity in brain and plasma have been widely used to document sublethal exposure of wild birds to OPs (for a review see Mineau, 1991). A 50% depression in brain AChE activity has been suggested as a diagnostic of anticholinesterase-induced death (Ludke et al., 1975), whereas a 20 % inhibition was judged sufficient to confirm an exposure to OPs (Zinkl et al., 1981).

While the causes of mortality have been extensively studied (for a review see Mineau, 1991), the consequences of sublethal doses of OPs on non-target species have received little attention. Recent studies demonstrate that sublethal doses of OPs induce behavioral responses that can have a direct bearing on the survival and/or reproductive potential of an individual. Acute exposure to OPs induces a profound depression, as shown by a reduction of a wide variety of behavioral outputs, both innate and learned (Bignami et al., 1975). Any symptomatic behavior should be interpreted as a visual sign of physiological impairments occurring in a short or long term. In fact, the direct consequence of an inhibition of AChE is an accumulation of acetylcholine (ACh) in the synaptic clefts (Taylor, 1990). Since ACh is an ubiquitous neurotransmitter found both in the central and the peripheral nervous systems, a large variety of symptoms related to ACh accumulation are expected to manifest themselves (Russel, 1982). In order to shed more light on wild birds' chances of survival following an exposure to dimethoate, we tested the impact of a wide range of dimethoate concentrations on red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). To our knowledge, the impact of low doses of dimethoate on non-target species has not been documented in the literature. Therefore, the aim of this study was to determine the

range of sublethal doses of dimethoate required to induce signs of intoxication and to evaluate the duration of these signs by monitoring daily activity level.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male red-winged blackbirds were captured from wild populations with mist nets and held in aviaries for at least a month prior to testing to allow acclimatization, as recommended by Oring et al. (1988). During this period, cracked corn and vitaminated water were provided *ad libitum*. Relative humidity was $45 \pm 5\%$, temperature 23.0 ± 0.5 °C and illumination on a 12:12 LD cycle under natural intensity.

Before intoxication, the birds were assigned to individual cages (42 x 22 x 30 cm) each enclosed within a sound-proof box (1m x 1m x 1m). Relative humidity was $47 \pm 5\%$, temperature 23 ± 1 °C, illumination at 11 ± 0.5 lux on a 12:12 LD cycle and air circulation maintained with a flow of 25 l/sec (Brunet and Cyr, 1992). Cracked corn and water were provided *ad libitum*. Cygon 2E was purchased as a solution containing 24.9 g dimethoate/100 ml Cyclo-Sol 63 (American Cyanamid Co.). Radvanyi *et al.* (1986) have demonstrated that the solvent does not in itself inhibit the activity of brain AChE. Dilutions were prepared in 0.2 ml distilled water and given directly into the birds' crop with a syringe connected to a canula.

Experiment A: Symptoms of intoxication of red-winged blackbirds to dimethoate

The different symptoms of intoxication were surveyed using a total of 65 birds and 35 different doses of dimethoate ranging from 0 to 1000 mg/kg BW. The birds were video-recorded under constant illumination (11 ± 5 lux) for a period of 24 hours following intoxication. The symptoms, recorded by first appearance and duration, were: ataraxia,

hyperexcitability, piloerection, tremors, vomiting, tachypnea, myasthenia, dyspnea, ataxia, incoordination, defecation, tenesmus, diarrhea, opisthotonos, lethargy, and mortality. None of the 25 control birds force-fed with water manifested these symptoms. The treated birds were considered fully recovered when they could no longer be distinguished from the controls. For each dose, we also noted the delay between intoxication and the appearance of the first symptoms. Mortality rates and LD₅₀ were determined with another group of 35 birds and doses of dimethoate ranging from 0 to 30 mg/kg. Finally, a relationship between sublethal doses of dimethoate (0 to 30 mg/kg BW) and the duration of symptoms was established with another group of 35 birds.

Experiment B: Impact of dimethoate on red-winged blackbirds' activity level

This experiment was carried out under a 12:12 LD light cycle (11 lux) with 7 groups of 10 birds. Five groups received a specific dose of dimethoate: 6.69 mg/kg BW, 2.23 mg/kg BW, 1.34 mg/kg BW, 0.96 mg/kg BW or 0.74 mg/kg BW. Two control groups were included: birds force-fed with water (stress control) and untreated birds monitored as a control on activity level through time (time control). The activity level of each bird was measured from perch-hopping activity. Each cage was equipped with two perches connected to a microswitch linked to an event recorder (Brunet, 1990) on a Macintosh computer. The activity level of each bird was expressed as the mean daily number of perch hoppings per hour (PH/h). The impact of dimethoate on the birds was considered to start with the force-feeding and to end when their activity level had reached a stationary phase.

Statistical tests

Significance of the linear relationships established between symptoms appearance and dose of dimethoate, as well as between mortality rate and dose of dimethoate was tested by an analysis of variance. A X^2 test was used to compare the birds' daily activity distribution before and after intoxication. The mean daily activity level of each group of birds expressed before intoxication was compared with those expressed during or after

intoxication using paired-sample Wilcoxon tests. Finally, non-parametric single factor analysis of variance (Kruskal-Wallis), followed by Mann-Withney tests, were carried out to compare the duration of the effects of different doses of dimethoate on the birds activity level. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Time- and dose-dependent symptoms of intoxication to dimethoate

A series of symptoms of intoxication were recorded from red-winged blackbirds following ingestion of various doses of dimethoate. The lowest dose tested was 0.34 mg/kg BW and the highest dose tested without observable effects was 1.64 mg/kg BW. Figure 1 presents the list of symptoms in order of appearance and for increasing doses of dimethoate, from ataraxia to death. For instance, the birds exposed to doses ranging between 1.75 and 2.00 mg/kg BW experienced ataraxia, followed by pilorection and dehydration (defecation and diarrhea). With doses ≥ 2.5 mg/kg BW, neuromuscular disfunctions including hyperexcitability, tremors, muscular fatigue (myasthenia), ataxia and incoordination, preceeded dehydration. Episodes of vomiting, as well as accelerated (tachypnea) and shallow (dyspnea) breathing were frequently experienced by birds that ingested between 3.00 and 4.00 mg/kg BW. Muscle paralysis (opisthotonos) and death started to occur at a dose of 4.90 mg/kg BW. Several symptoms appeared erratically at higher doses, as the more severe symptoms, including death, happened too quickly for the birds to experience the first milder effects of the pesticide, or for the observer to detect them. These results suggest that it may be possible to estimate the degree of intoxication of a bird from its symptoms of intoxication, especially between 1.64 and 4.90 mg/kg BW.

TABLE 1

Mean daily perch-hopping activity level of red-winged blackbirds recorded before and after exposure to a sublethal dose of dimethoate. Values are expressed as percent variation from the mean daily activity level maintained before exposure (days 1 to 8), considered as 100%. The mean activity level adopted during exposure was computed from the values found either significantly lower or higher than the mean value measured before exposure. The mean activity level expressed after intoxication was computed from the last five days of experiment (n=10).

Doses (mg/kg BW)	Activity level (%)		
	Before exposure	During exposure	After exposure
Time control*	100.0 ± 14.9	-	81.0 ± 12.8
Stress control*	100.0 ± 18.3	-	87.0 ± 18.6
6.69	100.0 ± 7.8	23.1 ± 23.0	80.5 ± 17.0
2.23	100.0 ± 11.3	38.7 ± 26.1	107.0 ± 13.2
1.34**	100.0 ± 9.5	32.0 ± 19.7	102.0 ± 13.5
1.34**	100.0 ± 19.3	203.0 ± 31.1	122.0 ± 17.6
0.96	100.0 ± 9.8	230.0 ± 45.8	75.0 ± 27.6
0.74	100.0 ± 14.6	211.0 ± 39.7	99.7 ± 26.4

* Two control groups were included: birds force-fed with water (stress control) and untreated birds monitored as a control on activity level through time (time control).

**The group of birds treated with 1.34 mg/kg BW was separated into two subgroups: the birds that decreased (n=4) and those that increased (n=6) their activity level.

A relationship was established between the time elapsed before the appearance of the first symptoms and the pesticide concentration (Fig. 2). The delay decreased from 730 to 10 min with doses increasing from 1.75 to 75.00 mg/kg BW ($P < 0.05$, $r^2=0.71$, $F = 436.14$). This figure also shows that all birds submitted to a dose of dimethoate lower than 4.9 mg/kg BW survived, whereas all birds given a dose higher than 28.0 mg/kg BW died within 24 hours. Figure 3 presents the mortality rate of the birds as a function of the dose of dimethoate ingested ($P < 0.05$, $r^2 = 0.92$, $F = 507.93$). The acute oral median lethal dose (LD_{50} with 95% confidence limits) by probit analysis was estimated at 9.9 mg/kg BW.

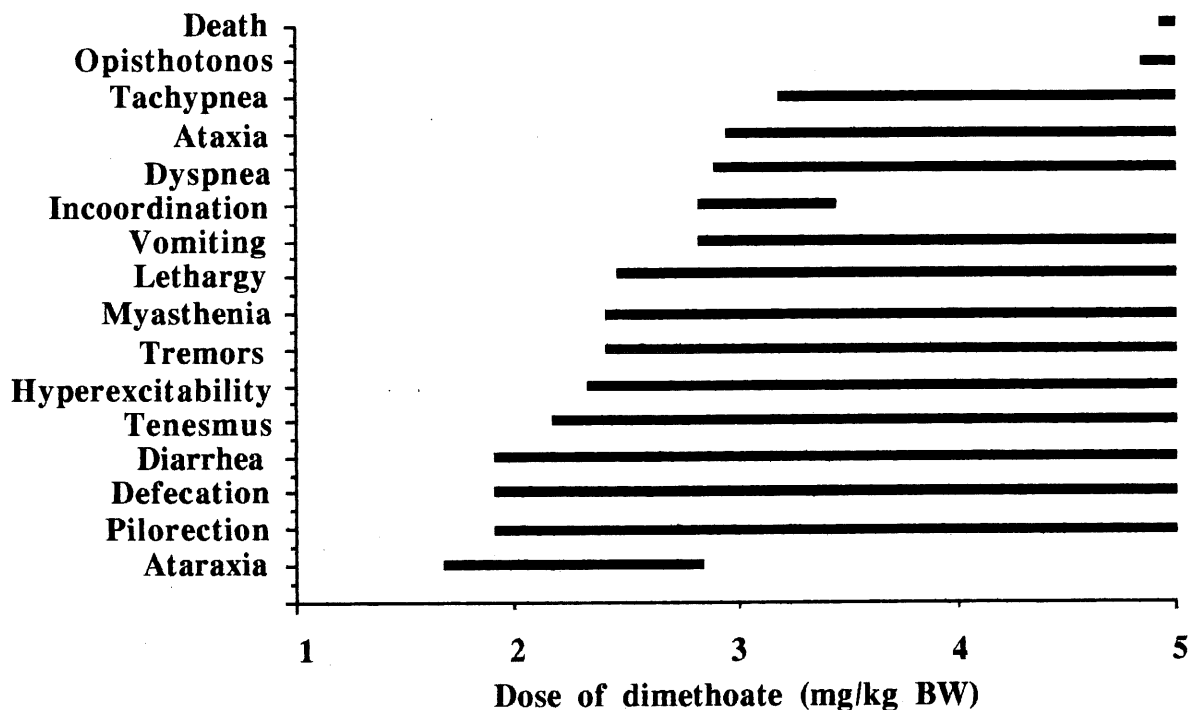


Fig.1. List of the symptoms of intoxication of red-winged blackbirds to ingested dimethoate, in order of appearance and according to the dose, from ataraxia to death (n=27).

Another group of birds was submitted to sublethal doses of dimethoate (1.5 to 28.0 mg/kg BW) in order to investigate the duration of the symptoms of intoxication. Since death started to occur with 4.9 mg/kg BW (Fig. 1), measurements taken on the birds that died were not included. Intoxication was considered to begin with the appearance of the first symptoms and to end when the birds started to behave like the control birds. Figure 4 presents a relationship between the duration of intoxication and the dose of dimethoate. The signs of intoxication lasted between 100 and 400 min with doses inferior to 2.5 mg/kg BW, and tended to reach a plateau around 750 min with doses superior to 15.0 mg/kg BW. Thus, a single exposure to a sublethal dose of dimethoate is expected to disturb the birds' activities at least an hour, and up to 12 hours for those that survive to doses higher than 4.9 mg/kg BW.

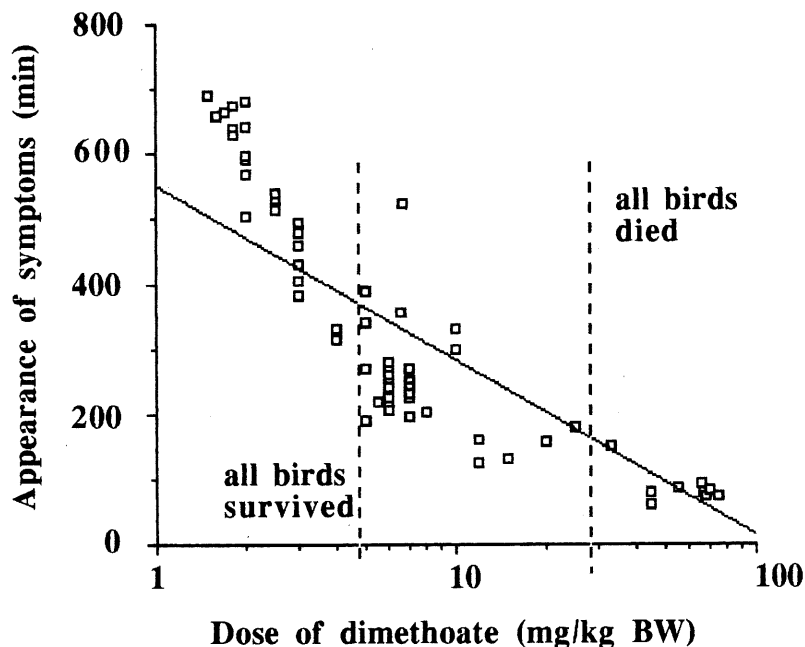


Fig. 2. Linear relationship between the time of appearance of the first symptoms after intoxication and the dose of dimethoate ingested by red-winged blackbirds ($y = 551.54 - 268.95 \log x$; $r^2 = 0.71$). Each symbol represents one individual ($n=65$).

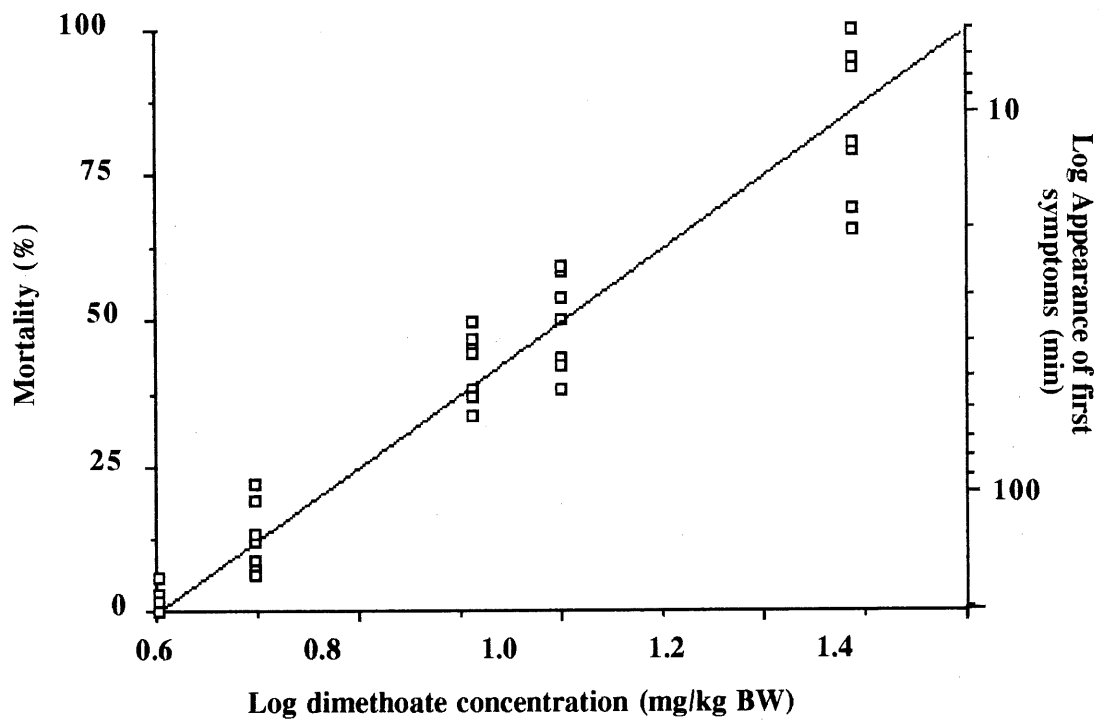


Fig. 3. Linear relationship between the mortality rate (%) of red-winged blackbirds and the dose of dimethoate on a logarithmic scale ($y = -77.21 + 128.15x$; $r^2 = 0.92$). Each symbol represents one individual ($n=48$).

Impact of dimethoate on the activity level of red-winged blackbirds

The effect of sublethal doses of dimethoate on the activities of red-winged blackbirds was investigated by recording their daily perch-hopping activity level before and after exposure, over a period of 30 days. We also included two control groups to take into account the impact of handling stress and captivity on their activity level through time. Figure 5 presents the mean daily activity level of 10 birds for five different doses of dimethoate, ranging from 0.74 to 6.69 mg/kg BW. The activity level of each bird was expressed as the percentage of the average activity level of the whole group on the first day, taken as 100%. The activity level of the control birds remained undisturbed through time. In contrast, strong behavioral responses were measured after drug ingestion. The birds that received either 6.69 or 2.23 mg/kg BW all reacted by becoming significantly less active for several days ($P < 0.0001$, $X^2_{6.69}=392.03$; $P < 0.0001$, $X^2_{2.23}=436.74$). In contrast, the birds treated with lower doses, 0.96 or 0.74 mg/kg BW, became hyper-active ($P < 0.0001$, $X^2_{0.96}=1015.65$; $P < 0.0001$, $X^2_{0.74}=117.31$). The transition between those two opposite reactions was positioned around 1.34 mg/kg BW, as about half the birds became less active ($P < 0.0001$, $X^2_{1.34}=78.53$) and the others more active ($P < 0.0001$, $X^2_{1.34}=97.65$) than before intoxication. Thus, dimethoate can cause either an increase and a decrease in activity level, depending on the concentration absorbed by the bird.

The birds' activity levels recorded before and after pesticide ingestion are summarized in Table 1. For each group, a mean value was calculated from the daily activity levels of the 10 birds recorded over the first 8 days of experiment (before intoxication). The mean activity level resulting from pesticide ingestion (during intoxication) was calculated from assessments made during days when the daily activity levels were found either significantly lower or higher than the mean value obtained before intoxication. Finally, the mean activity level expressed by the birds after they had recovered from the pesticide effects (after intoxication) was computed from the activity levels of the last five days of

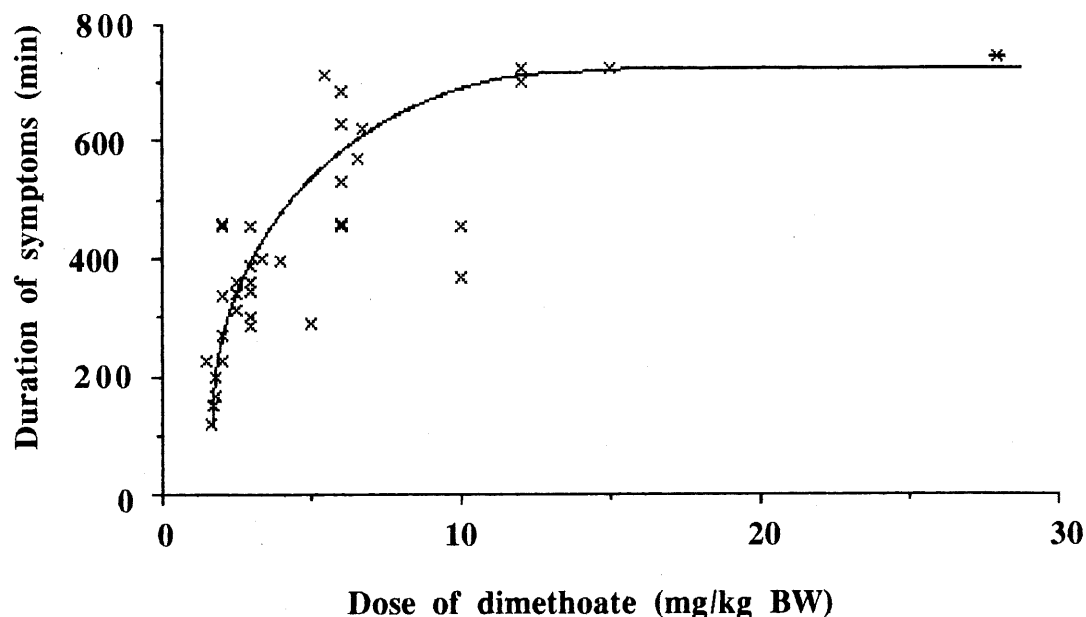


Fig. 4. Relationship between the duration of the symptoms of intoxication of red-winged blackbirds as a function of sublethal doses of dimethoate ($y = 145.87 + 462.84 \log x$). Each symbol represents one individual ($n=35$).

experiment. The mean activity levels measured during and after intoxication were then expressed as percentages of the mean activity level maintained before intoxication, which was considered as 100%. These results show that dimethoate markedly modified red-winged blackbirds' activity level. The birds that experienced a depressive state after ingestion of 6.69, 2.23 or 1.34 mg/kg BW reduced their activity level to 23.1%, 38.7% and 32.0%, respectively ($P < 0.001$, $Z_{6.69}=-8.13$; $Z_{2.23}=-9.36$; $Z_{1.34}=-6.43$). On the other hand, those that became hyperactive in response to 1.34, 0.96 or 0.74 mg/kg BW at least doubled their daily activity level ($P < 0.001$, $Z_{1.34}=-5.66$; $Z_{0.96}=-6.17$; $Z_{0.74}=-5.49$). These results clearly indicate that the impact of dimethoate on the birds activities was strongly felt, regardless whether they responded by an increase or a decrease in activity level.

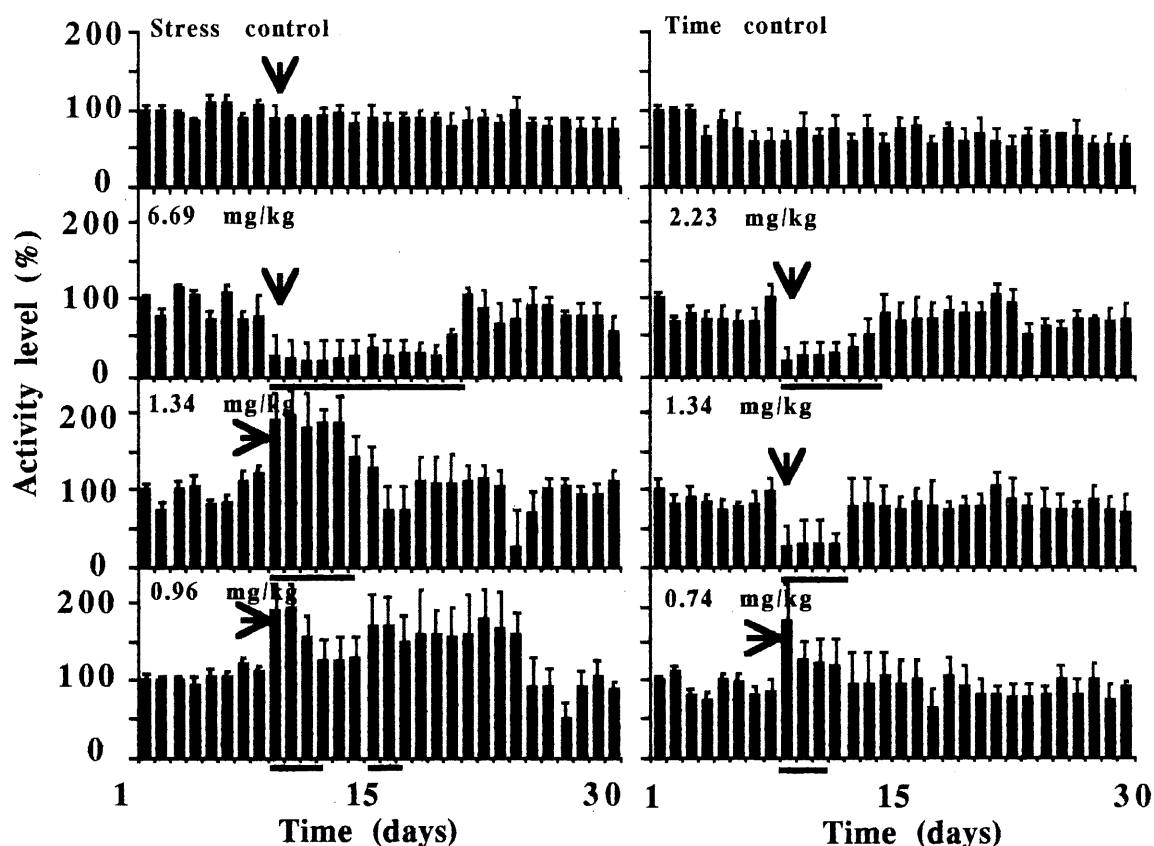


Fig. 5. Frequency distribution of red-winged blackbirds perch-hopping activity before and after ingestion of sublethal doses of dimethoate. Each vertical bar represents the mean (\pm SEM) daily number of perch hoppings per hour (PH/h) of all 10 birds of each group. The pesticide was ingested on day 9 (arrow) and the bars underneath each distribution indicate the days on which the activity level was either significantly lower or higher than the mean value obtained for the eight days before intoxication.

By the end of the experiment, the activity levels of the time and stress control birds had gradually decreased to 81 and 87%, respectively ($P < 0.05$, $Z_{\text{time}} = -2.44$; $P < 0.001$, $Z_{\text{stress}} = -2.09$). Since these values were not statistically different, the birds activity level was apparently not affected by the stress due to the force-feeding. As for the treated birds,

although most mean values of the last five days were still different from that expressed before intoxication ($P < 0.001$, $Z_{6.69} = -2.80$; $P < 0.01$, $Z_{2.23} = -2.43$; $P < 0.05$, $Z_{1.34}$ (hyperactive) $= -2.33$; $P < 0.001$, $Z_{0.96} = -3.63$), their activity level tended to stabilize around 100% or close to those of the control birds. The large standard errors prevented statistical discrimination among the mean activity levels of each group at the end of the experiment.

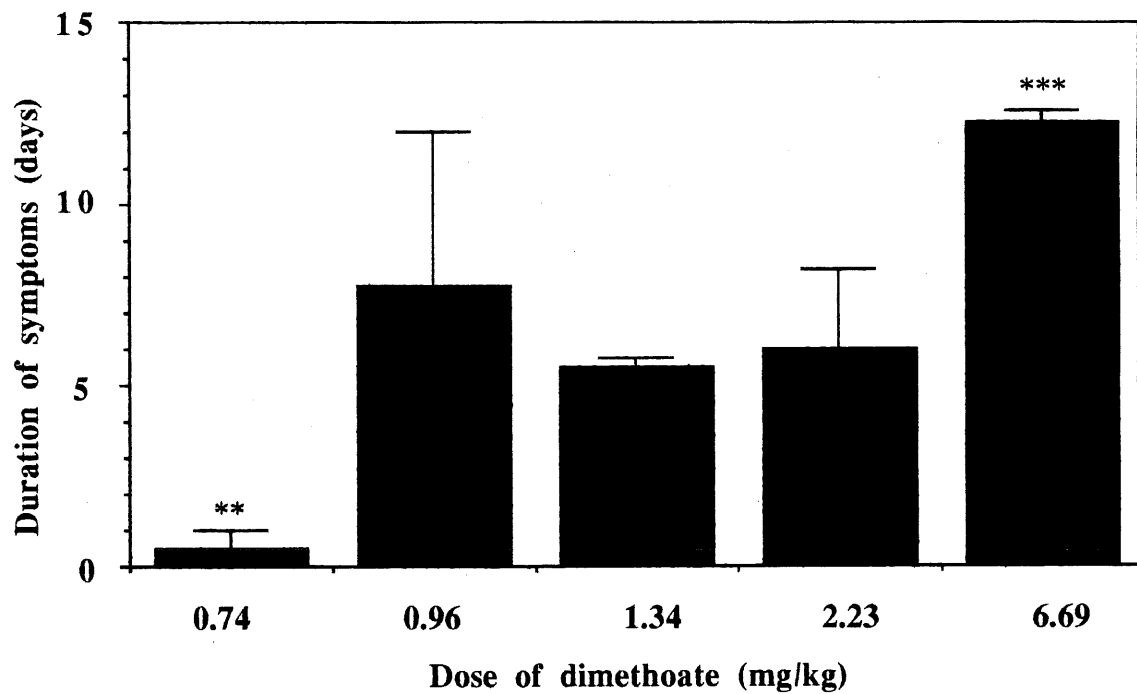


Fig. 6. Duration of the effects of sublethal doses of dimethoate on red-winged blackbirds' daily activity level. Values represent the mean (\pm SE) of the activity level of 7 birds. The birds treated with 6.69 mg/kg BW remained affected longer than any other birds, and those treated with 0.74 mg/kg BW recovered more rapidly than the others. Intermediate doses generated intermediate durations that could not be distinguished by statistical analysis. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

The impact of the pesticide on the birds perch-hopping activity lasted between 0.5 and 12.3 days, depending on the concentration (Fig. 6). The birds treated with 6.69 mg/kg

BW remained affected longer than any other birds ($U=91$; $P < 0.001$), and those treated with 0.74 mg/kg recovered more rapidly than the others ($U=83$; $P < 0.01$). This tendency was not influenced by the type of reaction to the intoxication, since the mean activity levels of the depressive (5.5 days) and hyperactive (5.7 days) birds that received 1.34 mg/kg BW were not statistically different. The large standard error obtained for the group treated with 0.96 mg/kg BW could be explained by the sporadic increases in activity level observed over several days (Fig. 5). Thus, the impact of dimethoate on the birds activity level persisted several days, whereas symptoms of intoxication disappeared within hours. These results clearly demonstrate that the birds activity level constitutes a more sensitive indicator of the duration of the effects of dimethoate on the birds metabolism than the symptoms of intoxication.

DISCUSSION

Oral ingestion of dimethoate by red-winged blackbirds in captivity induces a wide variety of symptoms, which nature and duration depend on the pesticide concentration. Previous reports on the impact of sublethal doses of OPs were performed with narrow ranges of pesticides and records limited to daily activities such as flying, feeding and singing (Banks and Russel, 1967; Grue and Shipley, 1981; Grue, 1982; Fairbrother et al., 1991; Hart, 1993). In this work, we present for the first time an extensive survey of 16 different types of behavioral symptoms, in their order of appearance through time and according to the dose of dimethoate, ranging from 0 to 1000 mg/kg BW. The first signs of intoxication, which consisted in pilorection and dehydration (defecation and diarrhea), were detected with a dose of 1.75 mg/kg BW. Above 2 mg/kg BW, the birds experienced a number of other symptoms before dehydration, including muscle incoordination and fatigue leading to respiratory distress. Muscle paralysis (opisthotonos) and death started to occur with doses above 5 mg/kg BW. At higher doses, several symptoms appeared erratically, as the more severe symptoms, including death, happened too quickly for the birds to experience the first milder effects of the pesticide. All birds submitted to a dose of dimethoate lower than 4.9 mg/kg survived, whereas all birds given a dose higher than 28.0 mg/kg BW died within 24 hours. LD₅₀ was estimated at 9.9 mg/kg BW, which is in the range reported in

the literature for other birds species, 6.6 and 22.0 mg/kg BW (Shafer, 1972; Bakre and Rajasekaran, 1989).

The activity level of red-winged blackbirds was also affected by dimethoate, but at doses for which symptoms of intoxication were not detected. Their activity level started to respond at 0.74 mg/kg BW, whereas the first visual signs of intoxication were observed with 1.75 mg/kg BW. Interestingly, two opposite responses were reported within 0.74 to 6.69 mg/kg BW. The birds submitted to doses ≤ 0.96 mg/kg BW nearly doubled their perch-hopping activities, whereas higher doses resulted in a reduction to approximately one-third of their initial activity level. Acute doses of OPs have been shown to suppress the activities of other birds and mammals (Shaker et al., 1988; Bignami et al., 1975; Grue and Shipley, 1981). In a previous study, we tested the impact of sublethal doses of dimethoate provided as baits on three granivorous species: song sparrows (*Melospiza melodia*), savannah sparrows (*Passerculus sandwichensis*) and american goldfinches (*Carduelis tristis*) (Brunet and Cyr, 1992). All three species became less active after they ingested in average 5.7, 5.3 and 5.4 mg/kg BW, respectively. These findings corroborate the results we obtained for the doses ≥ 1.34 mg/kg BW. This reduction in activity level could be explained by the fact that organophosphorus pesticides inhibit cholinesterase activities, from which follows an accumulation of ACh and muscle cramps (Corbett, 1974). We also report that doses of dimethoate ≤ 1.34 mg/kg BW initiate increases in activity level. Other cases of hyperactivity following exposure to low doses of OPs have been reported in the literature (Grue et al., 1991; Hart, 1993). Thus, it may be possible to establish a relationship between the dose of OP and the type of response of a bird's activities (increase or decrease) that could provide a first estimate of the dose absorbed.

The rates at which the signs of intoxication and the effects on the activity levels of red-winged blackbirds appeared and disappeared were dose-dependent, as reported for other OPs (Bakre and Rajasekaran, 1989; Gomez-Arroyo et al., 1987). The visual symptoms of intoxication lasted from 100 to 750 min after intoxication with increasing doses from 1.75 to 15.00 mg/kg BW. These results are in agreement with those of Hudson et al. (1984), who reported that animals are symptom free 24 hours after exposure to sublethal doses of OPs. However, according to their daily activity level, the birds were still affected by the

pesticide several days after intoxication, regardless whether they showed an increase or a decrease in activity level. For instance, the effects of a dose of 6.69 mg/kg BW on the birds activity level persisted about 12 days. This is in the same range as we previously reported for three granivorous species, song sparrows, savannah sparrows and american goldfinches, with 6 to 15 days after ingestion of about 5.5 mg dimethoate/kg BW (Brunet and Cyr, 1992). Therefore, even though the visual signs of intoxication disappear within hours after ingestion of the pesticide, the physiological impact of a single sublethal dose of dimethoate on non-target species may last several days after the pesticide was sprayed on a field.

Although enzyme assays indicate that the birds excrete OPs within hours (O'Brien and Yamamoto, 1970), the slow recovery in activity level does not necessarily parallel the gradual disappearance of dimethoate in the bloodstream. In fact, the activity level was shown to be proportional to brain AChE activity in rodents (Bignami et al., 1975) and birds (Bakre and Rajasekaran, 1989). Flemming and Grue (1981) reported that cholinesterase levels take much more time to return to normal levels than do OPs to be eliminated. Brain cholinesterase (ChE) activities of mallard ducks, bobwhite quails, barn owls, starlings and common grackles were shown to take in average 26 days to recover after being depressed by 55-64% with oral doses of dicotophos (Flemming and Grue (1981). Therefore, the activity level would constitute a more sensitive indicator of changes in brain AChE activity than intoxication symptoms.

Several experiments were conducted in an attempt to establish a relationship between symptoms of intoxication and AChE activity (Fairbrother et al., 1991). Unfortunately, the conclusions were highly contradictory. For instance, Banks and Russell (1967) reported that a 40 to 60 % inhibition of brain AChE was necessary to detect the first ethological signs of intoxication, which is much higher than what was proposed by Hart (1993). Kurtz (1977) could not detect any relationship between percent AChE inhibition and behavioral symptoms caused by malathion. Thus, the behavioral signs of intoxication can not provide an estimate of brain AChE inhibition. Nevertheless, the informations gathered here on the visual symptoms of exposure could be used to estimate the degree of OP exposition and chances of survival in studies in which animals cannot be manipulated.

In conclusion, we have demonstrated that sublethal doses of dimethoate may endanger non-target species by altering their activities and physiological responses to environmental stresses over several days. Intoxication symptoms and activity level could provide useful information in laboratory experiments in which the pesticide is mixed with food and where bird handling must be avoided. Intoxication symptoms would indicate the dose of dimethoate absorbed, whereas the activity level would serve as an indicator of brain AChE activity.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the National Science and Research Council of Canada.

REFERENCES

- Anderson, R.A., Laake, K. and Fonnum, F., 1977. Reactions between alkyl phosphates and acetylcholinesterase from fish and rodents. *Gen. Pharmacol.*, 8: 307-314.
- Bakre, P. and Rajasekaran, M., 1989. Acute toxicity of certain pesticides to House Sparrow (*Passer domesticus*). *Geobioscience*, 16: 249-251.
- Banks, A. and Russell, R.W., 1967. Effects of chronic reductions in acetylcholinesterase activity on serial problem-solving behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 64: 262-267.
- Bignami, G., Rosic, N., Michalek, H., Milosevic, M., and Gatti, G.L., 1975. Behavioral Toxicity of Anticholinesterase Agents. In: B. Weiss and U.G. Laties (Editors), *Methodological, Neurochemical, and Neuropsychological Aspects*. Plenum Press, New York, pp. 155-215.
- Brunet, R. and Cyr, A., 1992. The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. *Agric. Ecosys. Environ.*, 41: 327-336.

Brunet, R., 1990. Relation entre les différents facteurs des rythmes circadiens et la hiérarchie sociale chez le Carouge à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*). Mémoire de Maîtrise. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 196 pp.

Corbett, J.R., 1974. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. Academic Press, New York, 330 pp.

Donovan, M.P., Schein, L.G. and Thomas, J.A., 1979. Effects of pesticides on metabolism of steroid hormones by rodent liver microsomes. J. Environ. Pathol. Toxicol. 2: 447-454.

Duffy, F.H. and Burchfiel, J.L., 1980. Long-term effects of the organophosphate sarin on electroencephalograms of monkeys and humans. Neurotoxicology, 1: 667-690.

Fairbrother, A., Marden, B.T., Bennett, J.K. and Hooperds, M.J., 1991. Methods Used in Determination of Cholinesterase Activity. In: P. Mineau (Editor). Cholinesterase-inhibiting Insecticides. Elsevier, New York, pp. 35-71.

Flemming, W.J. and Grue, C.E., 1981. Recovery of AChE activity in 5 avian species exposed to dicotophos, an OP pesticide. Pest. Biochem. Physiol., 16: 129-135.

Gill, T.S. and Pant, J.C., 1987. Carbaryl and dimethoate induced alterations in blood and tissue in cholesterol of a cyprinid (*Barbus chonconus*). Ham. Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B (Biol. Sci.), 57: 367-370.

Gomez-Arroyo, S., Noriega-Aldan, N., Juarez-Rodriguez, D. and Villalobos-Pietrini, R., 1987. Sister chromatid exchange induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinphos in cultured human lymphocytes. Contam. Ambienta, 1: 63-70.

Grue, C.E., 1982. Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. Arch. Env. Contam. Toxicol., 11: 617-626.

Grue, C.E., Hart, A.D.M. and Mineau, P., 1991. Biological Consequences of Depressed Brain Cholinesterase Activity in Wildlife. In: P. Mineau (Editor). Cholinesterase-inhibiting Insecticides. Elsevier, New York, pp. 151-209.

Grue, C.E. and Shipley, B.K., 1981. Interpreting population estimates of birds following pesticide applications - behavior of male starlings exposed to an organophosphate pesticide. *Studies Avian Biol.*, 6: 292-296.

Hart, A.D.M., 1993. Relationship between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 321-336.

Hill, E.F. and Fleming, W.J., 1982. Anticholinesterase poisoning of birds: Field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1: 27-38.

Hudson, R.H., Tucker, R.K. and Haegele, M.A., 1984. *Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife*. U.S. Dept. of Interior, Fish and Wildlife Serv., Resource. Publ. 153, 90 pp.

Khattab, F.I., El-Ganzuri, M.A. and Fares, N. H., Pakiston, L., 1986. Histochemical studies on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the nervous system of rat with special reference to its response to insecticidal intoxication. *J. Zool.*, 18: 9-22.

Kumar, M., 1989. Efficacy of certain insecticides in the control of sap beetles on the litchi fruit. *Pesticides (Bombay)* 23: 31-32.

Kurtz, P.J., 1977. Dissociated behavioral and cholinesterase decrements following malathion exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42: 589-594.

Ludke, J.L., Hill, E.W. and Dieter, E.F., 1975. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 3: 1-21

Maguire, C.C. and Williams, B.A., 1987. Cold stress and acute organophosphorus exposure: interaction effects on juvenile Northern Bobwhite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 477-481.

Mineau, P., 1991. *Cholinesterase-inhibiting Insecticides*. Elsevier, New York, 348 pp.

O'Brien, R.D. and Yamamoto, I., 1970. *Biochemical Toxicology of Insecticides*. Academic Press, New York, 218 pp.

Oring, L.W., Able, K.P., Anderson, D.W., Baptista, L.F., Barlow, J.C., Gaunt, A.S., Gill, F. B. and Wingfield, J.C., 1988. Guidelines for use of wild birds in research. *Auk*, 105: 1A-41A.

Packer, K., 1975. Nanogen Index. A Dictionary of Pesticides and Chemical Pollutants. Nanogens International. Freedom, CA, 256 pp.

Russel, R.W., 1982. Cholinergic system in behavior: The search for mechanisms of action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 435-463.

Schafer, E.W., 1972. The acute oral toxicity of 369 pesticidal, pharmaceutical and other chemicals to wild birds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 21: 315-330.

Shaker, N., Hassan, G.A., El -Nouty, F.D., Abo-Elezz, Z. and Abd-Allah, G.A., 1988. In vivo chronic effect of dimethoate and deltamethrin on rabbits. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 23: 387-400.

Smith, G.J., 1987. Pesticide use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds. Fish and Wildlife Service, Resource Publication 170, Washington D.C., 171 pp.

Spencer, E.Y., 1982. Guide to chemicals used in crop protection. 7th edition, Direction Générale de la Recherche, Agriculture Canada, 595 pp.

Taylor, P., 1990. Agents Acting at the Neuromuscular Junction and Autonomic Ganglia. In: A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor (Editors). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon Press, New York, pp. 166-186.

Wallace, K.B. and Herzberg, U., 1988. Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92: 307-314.

Zinkl, J.G., Roberts, R.B., Shea, P.J. and Lasmanis, J., 1981. Toxicity of acephate and methamidophos to Dark-eyed Juncos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10: 185-192.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. L'expression «potential danger» ne réfère pas au type ou à l'ampleur de la toxicité mais à un danger d'exposition potentiel.
2. Les oiseaux sont gardés en volière pendant une période minimale de 1 mois avant le début des expériences, à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, une humidité relative de $55 \pm 5\%$ et sous une photopériode de 12:12 (L:N). On leur fournit de la nourriture *ad libitum* composée de moulée laitière (16% de protéines), maïs concassé, mélange pour oiseaux sauvages et nourriture pour chatons Purina Kittenchow® dans une proportion de 2: 1: 1: 0,5. Par la suite, les oiseaux sont placés dans les cages 5 jours avant le début de l'expérience, et ce dans les mêmes conditions que celles qui prévalent au cours de l'expérimentation.
3. Les oiseaux ont été exposés au diméthoate par gavage et leur comportement a été observé pendant 24 heures suivant l'exposition (gavage).
4. À la figure 2, l'axe Y représente le temps qui s'écoule entre l'exposition par gavage (temps 0) et l'apparition des premiers symptômes quels qu'ils soient (temps Y).
5. La figure 3 représente 5 groupes d'oiseaux exposés à différentes doses de diméthoate (x). Chaque point représente un individu; ces points réfèrent au moment de l'apparition des premiers symptômes sur l'échelle logarithmique. La droite de régression réfère au nombre d'individus morts par groupe (données brutes non-illustrées).
6. À la figure 4, l'axe Y représente le temps écoulé entre l'apparition des premiers symptômes (temps 0) et le temps écoulé jusqu'à la fin des symptômes observés (temps Y).

CHAPITRE 4

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE SUIVI DE LA TEMPÉRATURE CORPORELLE CHEZ CERTAINES ESPÈCES D'OISEAUX

Le chapitre 4 ne traite pas directement des impacts du diméthoate, mais constitue une charnière importante dans le déroulement et la validation des chapitres suivants. En effet, on ne saurait commencer l'étude des modifications de la température corporelle, sans avoir fait au préalable la démonstration que la technique utilisée pour mesurer la température corporelle est efficace.

Dans le but de trouver une technique efficace de suivi et de détection des expositions aux OPs, le Service Canadien de la Faune a entrepris dans les années 80 l'évaluation de plusieurs techniques, dont celle du suivi de la température corporelle. L'idée gravite autour du fait que plusieurs chercheurs ont observé des perturbations de la température corporelle (hypothermie) suivant une intoxication à un OP (Myers 1987, Kozar *et al.* 1976, Murphy 1969). Il existe plusieurs méthodes de mesure de la température corporelle dont l'utilisation de thermocouples ainsi que des émetteurs thermosensibles internes (implants) et externes. Par l'absence de traumatismes reliés à la chirurgie ainsi que leur meilleure portée, les émetteurs thermosensibles externes s'avèrent avantageux comparativement aux émetteurs internes. Toutefois, il faut d'abord déterminer si la température cutanée peut être utilisée pour refléter la température corporelle interne. De plus, peu d'informations sont alors disponibles concernant l'emplacement idéal pour apposer l'émetteur sur l'oiseau. Ces deux aspects sont évalués dans cet article.

Dans les chapitres précédents nous avons démontré que les OPs, comme le diméthoate, provoquent chez les oiseaux des modifications dans les rythmes circadiens. Jusqu'à maintenant nous nous sommes attardés à l'étude des rythmes d'activités seulement, cependant d'autres paramètres chronobiologiques, tels que la température corporelle, sont également sujets aux perturbations causées par des intoxications aux OPs. Si elle s'avère efficace, la technique d'évaluation de la température corporelle par des émetteurs externes

nous permettra dans les prochains chapitres, de déterminer si le rythme circadien de la température corporelle est effectivement affecté par un OP.

RÉSUMÉ

Des émetteurs externes thermosensibles de longue portée sont habituellement utilisés pour suivre la température corporelle des oiseaux sur le terrain. Cependant, ces émetteurs enregistrent la température cutanée (Ts), une mesure qui diffère de la température corporelle (Tb) des individus, et qui est influencée par la température ambiante et par des changements dans le taux d'activité des oiseaux. Dans cette étude, nous avons démontré que Tb peut être extrapolée à partir de Ts, en plaçant l'émetteur à l'endroit approprié et à l'aide d'une équation mathématique. Tout d'abord, parmi six positions différentes sur des Carouges à épaulettes (*Agelaius phoeniceus*), un émetteur fixé à la base du cou, au-dessus de la veine jugulaire, procure les mesure de Ts les plus stables dans le temps ($35,15 \pm 1,13$ °C) et les plus près de Tb ($41,75 \pm 0,75$ °C), enregistrées simultanément par un émetteur interne inséré dans la cavité abdominale. L'émetteur externe reproduit les rythmes circadiens de Tb de l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) avec un Tb-Ts moyen de $4,23 \pm 1,21$ °C. Nous avons testé l'impact de la température ambiante (Ta) et du poids corporel chez le Sizerin à tête rouge (*Carduelis flammea*), l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*), la Tourterelle triste (*Zenaida macroura*), et le pigeon biset (*Columba livia*). Nous avons établi deux équations permettant d'extrapoler Tb à partir de Ts, en tenant compte de la température ambiante et du poids des oiseaux. Ces résultats permettront de valider l'utilisation d'émetteurs externes pour évaluer l'impact des facteurs environnementaux et des agents toxiques sur la température corporelle des oiseaux en milieu naturel.

Reproduction de l'article soumis sous le titre de:

BRUNET, R., J. DUMAIS and D. THOMAS. Improved method for monitoring avian body temperature. Physiological Zoology (Novembre 1996).

Note: le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Sous la supervision conjointe du Dr Don Thomas et de Richard Brunet, Jaques Dumais a participé, dans le cadre d'une initiation à la recherche, à la réalisation des expérimentations et aux analyses de certaines parties (3 et 4) du protocole expérimental.

ABSTRACT

Field monitoring of avian body temperature has been mostly conducted with external transmitters for their easy handling, reduced stress to the bird and much longer range of transmission than internal transmitters. However, they provide a measure of skin temperature (Ts), which differs from body core temperature (Tb), is sensitive to the birds' activities and to variations in ambient temperature. Nevertheless, we report that an external transmitter can be used to monitor efficiently avian body temperature, given the right position on the bird and a simple mathematical relationship. Among six different positions tested on red-winged blackbirds (Agelaius phoeniceus), a transmitter fixed on the jugular vein provided very consistent Ts readings through time (35.15 ± 1.13 C) and the closest values to Tb (41.75 ± 0.75 C), measured simultaneously by a transmitter implanted in the abdominal cavity. At this position, Ts was able to follow circadian changes in Tb of a european starling (Sturnus vulgaris), with a mean Tb-Ts difference of 4.23 ± 1.21 C. We then tested the impact of ambient temperature (Ta) and body weight on Tb and Ts using common redpolls (Carduelis flammea), european starlings (Sturnus vulgaris), mourning doves (Zenaida macroura), and pigeons (Columba livia). Multiple regression analysis of these results indicates that Tb can be extrapolated from Ts by two equations, taking into account body weight and ambient temperature. These informations will improve field monitoring of avian body temperature with long-range external transmitters.

INTRODUCTION

Endothermic organisms use both autonomic and behavioral types of response to maintain a stable body temperature. In birds, core body temperature (Tb) usually ranges between 40 C and 44 C during the day and between 37 C and 40 C at night (Prinzinger et al. 1991). However, food scarcity and/or cold load can lead to a marked decrease in Tb (25-35 C) during the resting phase, called "controlled hypothermia". Others confronted to extreme cold stress at night undergo torpor, a physiological state that allows Tb and metabolism to drop to extremely low levels (Prinzinger et al. 1991). The range of day-

night oscillation in Tb was also shown to increase with lower gonadal activity (Veghte 1964, Rutledge 1974) and with decreasing body weight (Merkel 1958).

Avian body thermoregulation has been studied with calibrated digital thermometers inserted into the cloaca (Bartholomew et al. 1983, Prinzinger et al. 1989, Lam and Harvey 1990, Warkentin and West 1990), the intestines (Inomoto and Simon 1981), or the rectum (Macleod et al. 1992). Telemetry transmitters were surgically implanted under the skin (West 1962, Hart and Roy 1967), in the vertebral canal (Hissa and Rautenberg 1974, Graf et al. 1989), or in the intraperitoneal cavity (Reinertsen 1980, 1982; Reinertsen and Haftorn 1984, Waite 1991, Phillips and Berger 1991). Although internal transmitters provide an accurate measure of body temperature, their use in field experiments has been limited because of their low range of transmission and the impact of surgery and anesthesia on the birds' behavior and survival.

Few studies have compared the impact of cold load and/or food deprivation on Tb and Ts in pigeons (Schmidt and Simon 1979, Hohtola 1982, Graf et al. 1989). Hohtola (1982) reported that ambient temperature (0-30 C) does not influence intraperitoneal Tb or backskin Ts, but caused a gradual decrease in Ts on their feet. Graf et al. (1989) showed that food deprivation initiated a decrease in both backskin Ts and spinal Tb during the dark phase. These studies suggest that an external transmitter positioned in an adequate location on the bird could replace internal transmitters in Tb measurements, following a mathematical transformation.

We developed a method to obtain accurate monitoring of avian body temperature with an external radio transmitter. We demonstrate that an external transmitter fixed at the base of the neck on the jugular vein gives Ts measurements of low variability through time during the birds active phase and can reproduce diurnal fluctuations in Tb. The influence of body weight and ambient temperature (Ta) on Tb-Ts was investigated using four different bird species (common redpolls, european starlings, mourning doves, and pigeons). From these results, we established two relationships that will allow to extrapolate Tb from Ts under these conditions.

This study was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada.

MATERIALS AND METHODS

Experimental birds

Red-winged blackbirds, common redpolls, european starlings, mourning doves, and pigeons were captured with mist nests. All birds were kept in large aviaries for at least one month before the experiments to allow acclimatization (Ad Hoc AOU Committee 1988), but no longer than three months to avoid changes in basal metabolism and body temperature (Warkentin and West 1990). During this period, they were fed *ad libitum* with cracked corn and mixed seeds commercially prepared for wild birds. Vitamins and minerals were added to drinking water. Relative humidity was $45 \pm 5\%$, ambient temperature 23.0 ± 0.5 C, and illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux).

Temperature measurements

The birds were equipped with external and/or internal thermosensitive radio telemetry transmitters. External transmitters of 1.8 g (Holohill) were fixed with surgical glue directly on the birds skin, after removing feathers and down. Six positions were tested: ventrally, on their abdomen (VA), between the wings (VBW), and underneath the wings (VUW); dorsally, on their lower back (DLB), between the wings (DBW), and at the base of the neck on the jugular vein (DNJ) (Fig. 1A). Small (1.5 g) internal transmitters (Holohill) were surgically implanted in the abdominal cavity under anesthesia (Reinertsen 1982). Briefly, a single incision was made on the right side, and two transmitters were inserted in the cavity: one on the right side and one on the left side (Fig. 1B). Experiments were performed one week after surgery (Reinertsen 1982). External transmitters recorded skin temperature (Ts), whereas internal transmitters recorded body

core temperature (T_b). Measurements were recorded as temperature-dependent pulse rate by a Lotek receiver. Ambient temperature was measured with a thermocouple connected to a digital thermometer.

Experimental procedures

In the first experiment, six red-winged blackbirds were used to determine where, on avian body, T_s is the least affected by the birds' activities during the day. Each bird was used to test all six positions, sequentially. They were housed together in a large aviary (2.7 x 2.7 x 3.3 m) providing multiple perching and feeding sites. Relative humidity was $50 \pm 3\%$, ambient temperature (T_a) 20 ± 1 C and light intensity 400 lux. T_s measurements were recorded at 10-min intervals during 180 min. Statistical analyses were performed with Wilcoxon sign rank tests for paired data (Zar 1984). In the second experiment, we recorded simultaneously T_s and T_b with three red-winged blackbirds equipped with an external transmitter on the jugular vein and two internal transmitters on either sides in the abdominal cavity. Temperature measurements and analyses were performed under the same conditions. Results indicated that the best conditions to monitor avian T_s and T_b are: an external transmitter on the jugular vein and an internal transmitter inserted in the abdominal cavity on the opposite side to the suture. These conditions were used in the remaining experiments.

In the third experiment, daily fluctuations in T_s and T_b of a european starling were recorded simultaneously every 10 min over a period of 65 hrs. The bird was confined to a sound-proof box (0.6 x 0.6 x 0.6 m) equipped with a perch, as well as enough food and water for the whole experiment. Relative humidity was $50 \pm 3\%$, T_a at 20 ± 1 C, illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux), and ventilation at 1.5 l/min. Circadian cycles were constructed from mean T_b and T_s values per hour. Simple regressions were performed between T_s and T_b during the dark and the light phases of the diurnal cycle (Zar 1984).

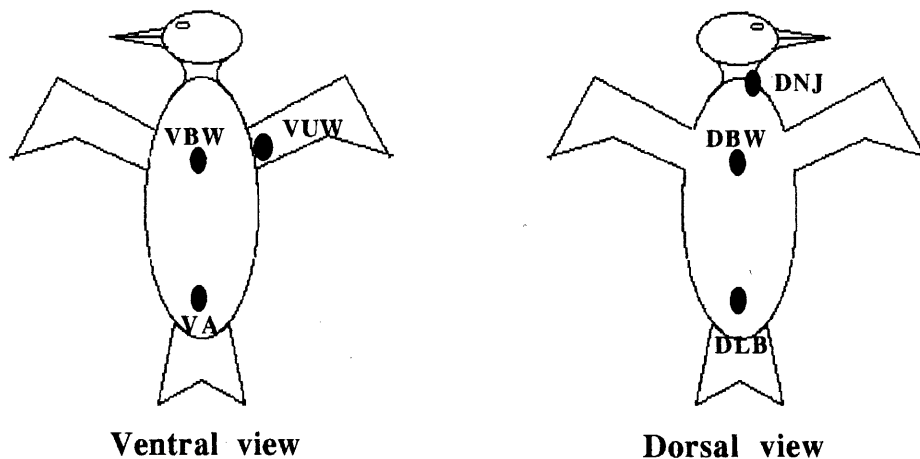
Finally, the impact of body weight and T_a on T_b and T_s was investigated with a common redpoll (13 g), two european starlings (79 g and 82 g), a mourning dove (119 g), and a pigeon (355 g). Each bird was confined to a sound-proof box as in the third experiment, but under constant illumination (400 lux). T_a was decreased stepwise from 30 to 25, 20, 15, 10, 5 and 0 C, with a period of 90 min at each temperature. The first 30 min were left for acclimatization, and both T_b and T_s were recorded at 10-min intervals during the following hour. Multiple regression analyses were performed to establish a relationship between T_b , T_s , T_a , and body weight (Zar 1984).

RESULTS

Six red-winged blackbirds were housed together in an aviary to investigate where skin temperature (T_s) is the least influenced by their activities. All six positions tested with external transmitters recorded similar T_s (34.68 C to 35.50 C), except for the one placed on the jugular vein, which tended to record higher values (36.33 ± 1.12 C). In contrast, consistency of the measurements through time differed among the six positions (Fig. 2). The worst position was ventrally under the wing, with T_s variations of ± 2.52 C over 180 min, a value significantly higher than all others ($Z_6 = -2.20$ to -2.24 , $P = 0.02$ to 0.03). The best position was dorsally on the jugular vein, with T_s variations of ± 1.25 C ($Z_6 = -2.05$ to 2.21 ; $P = 0.02$ to 0.03).

Three red-winged blackbirds were equipped with an external transmitter on the jugular vein and two internal transmitters surgically implanted in the abdominal cavity (Fig. 1B). Fig. 3 shows that the mean difference between body core and skin temperatures (T_b - T_s) obtained over 180 min was smaller with the internal transmitter inserted on the opposite side to the incision (BCO) than with the one located under the incision (BCI) ($Z_{54} = -2.201$; $P = 0.028$). Respective mean T_b values were 41.75 ± 0.75 C and 42.87 ± 0.90 C. The 1.12 C difference in temperature readings between the two internal transmitters suggests that the tissues around the suture have not fully recovered from surgery after a week. From these two sets of experiments, we propose that the best conditions to monitor avian T_b and T_s are: an external transmitter fixed on the jugular vein and an internal transmitter inserted in the abdominal cavity, on the opposite site to the suture.

A) POSITION OF EXTERNAL TRANSMITTERS



B) POSITION OF INTERNAL TRANSMITTERS

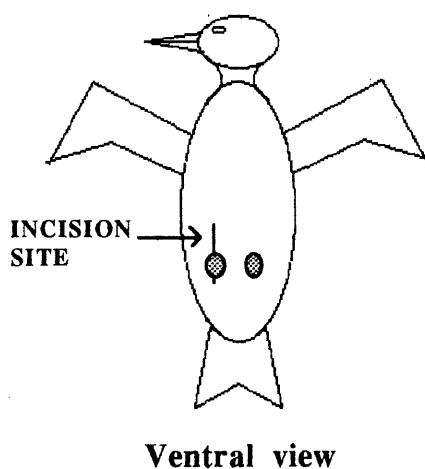


Fig. 1. Description of the different places where external and internal transmitters were positioned on red-winged blackbirds during the experiments. (A) External transmitters: ventrally on the lower abdomen (VA), between the wings (VBW), and underneath the wings (VUW); dorsally on the lower back (DLB), between the wings (DBW), and at the base of the neck on the jugular vein (DNJ). (B) Internal transmitters: inserted in the abdominal cavity, either on the right or the left side. A single incision was made on the right side.

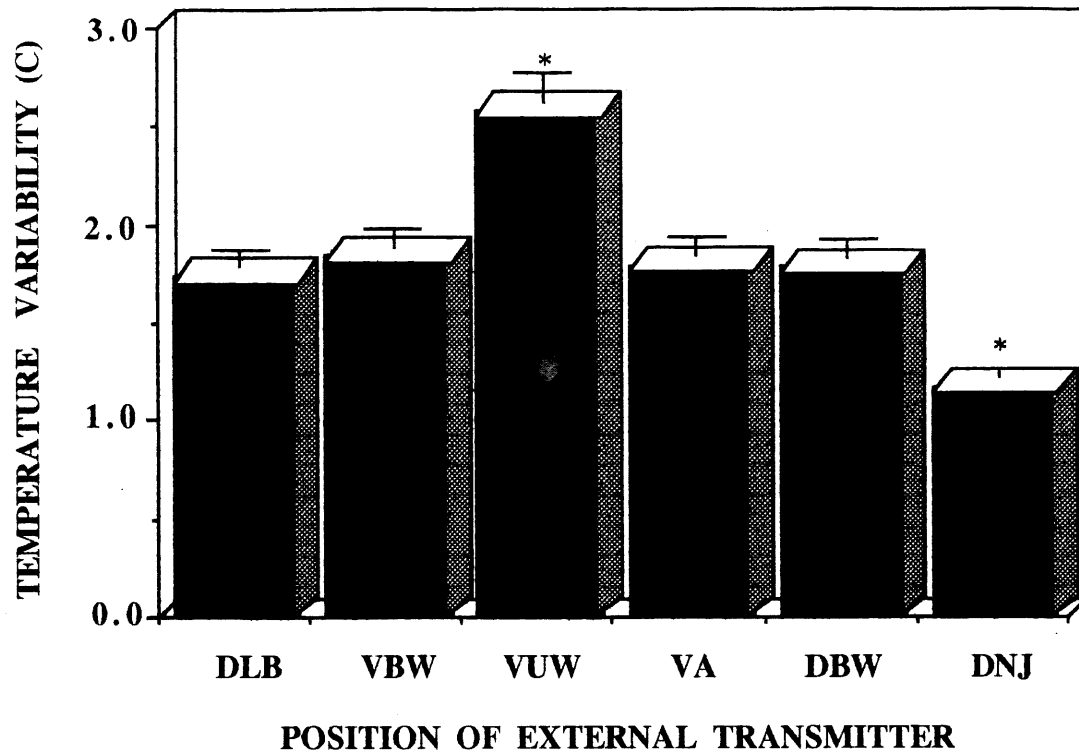


Fig. 2. Impact of the position of the external transmitter on the variability in skin temperature (T_s) through time during the light phase. Six red-winged blackbirds were used to test all six positions, sequentially, and measurements were taken every 10 min during 180 min. Each bar represents the mean \pm SEM temperature variability among the six birds. Values were compared by a Wilcoxon Signed rank test. * $p < 0.05$.

We used these conditions to demonstrate that T_s can be used to monitor diurnal variations in T_b . Fig. 4 shows typical circadian rhythms of T_b and T_s recorded for a european starling over 65 hrs under a 12:12 LD cycle and constant ambient temperature (20 C). The bird's T_b was maintained between 39.95 C and 42.52 C during the dark phase and between 42.09 C and 43.75 C during the light phase. The cycle of T_s was

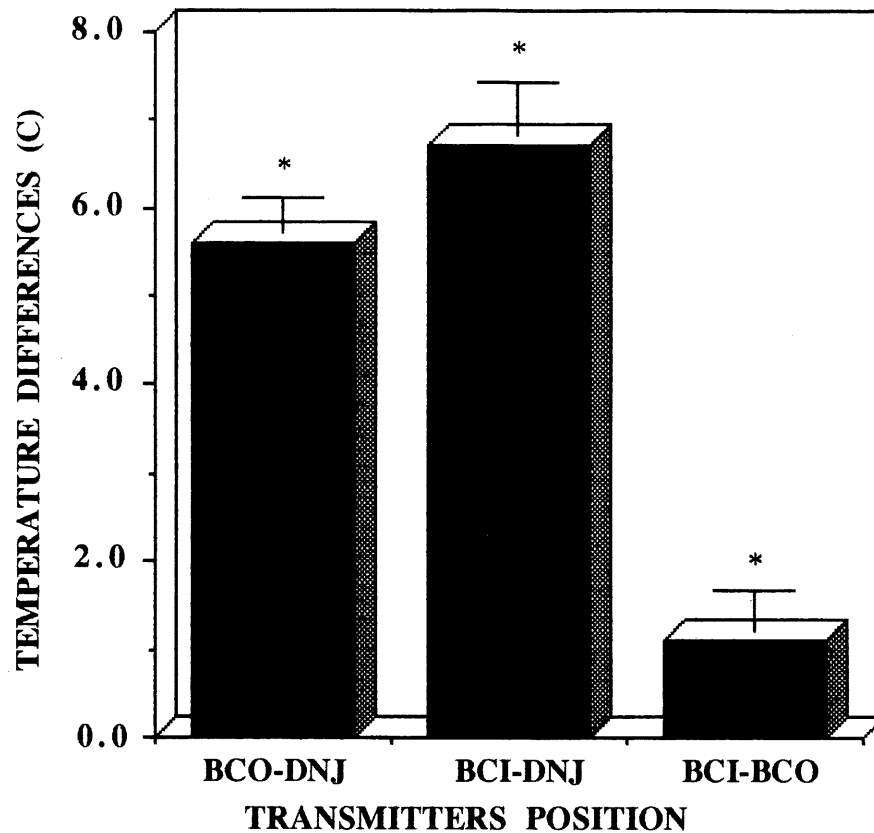


Fig. 3. Differences between body core and skin temperature (T_b - T_s) measured with an external transmitter positioned on the jugular vein (DNJ) and an internal transmitter inserted underneath the incision (BCI) or on the opposite side (BCO) of the abdominal cavity. Temperature readings from the two internal transmitters were also compared (BCI-BCO). Each comparison was performed with three red-winged blackbirds and measurements were taken every 10 min during 180 min. Each bar represents the mean \pm SEM temperature differences among the three birds. Values were compared by a Wilcoxon Signed rank test. * $p < 0.05$.

almost superimposable to that of T_b , with average temperature differences ($T_b - T_s$) of 4.23 ± 1.21 °C. Linear regression analysis demonstrated that T_b accounts for most of the variations in T_s measured during the dark phase (Fig. 5A) ($r^2 = 0.92$; $F_{34} = 408.5$; $P = 0.00011$). A weaker relationship was established during the light phase ($r^2 = 0.56$; $F_{28} = 12.7$; $P = 0.037$). The larger spread of the values around the slope could be explained by an increase in variability of T_s as a consequence of birds' activities (Fig. 5B). Thus, T_s can be used to follow variations in T_b under constant ambient temperature.

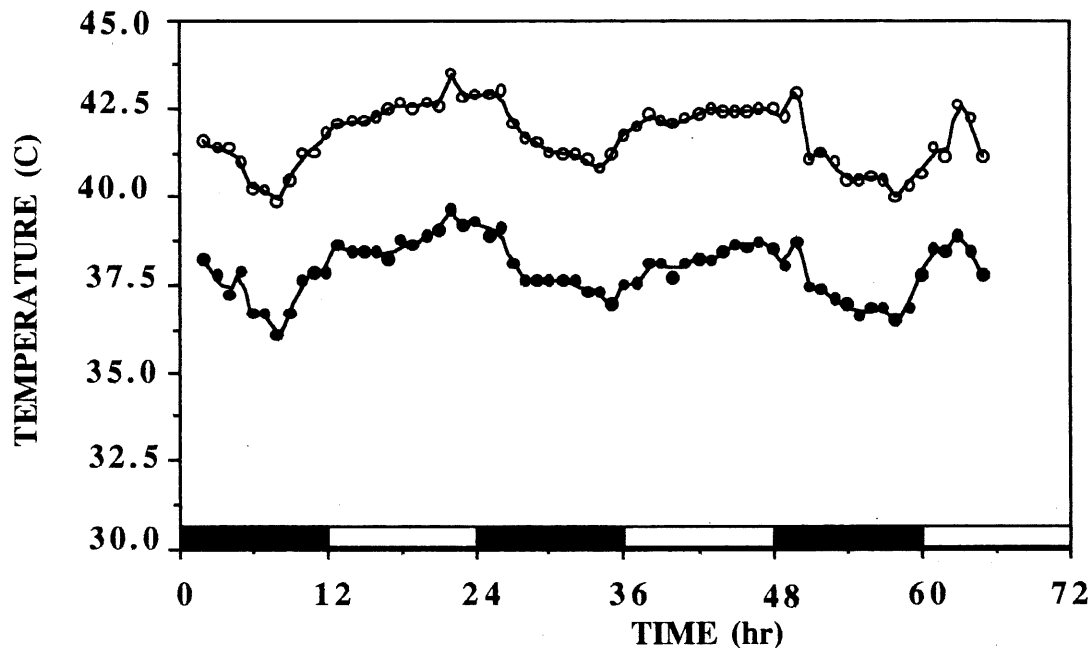
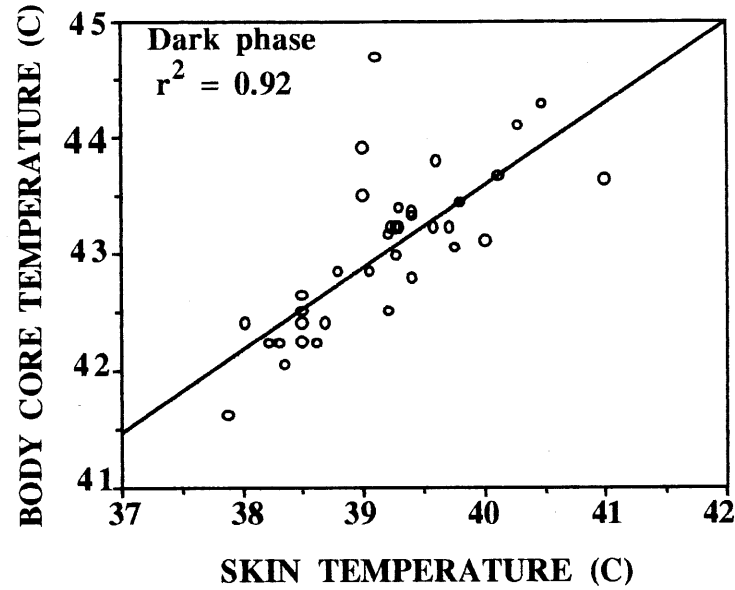


Fig. 4. Daily cycle of body core (○) and skin (●) temperature of a European starling under constant ambient temperature (20 °C) and a 12:12 LD cycle (400 lux). The external transmitter was fixed on the jugular vein and the internal transmitter inserted in the abdominal cavity, opposite to the suture. Measurements were taken every 10 min during 65 hrs, and temperature cycles were constructed with average values ($n=6$) per hour. SEM never exceeded 5% and were omitted for clarity. The dark phases of 12 hours are indicated by the black bars.

A)



B)

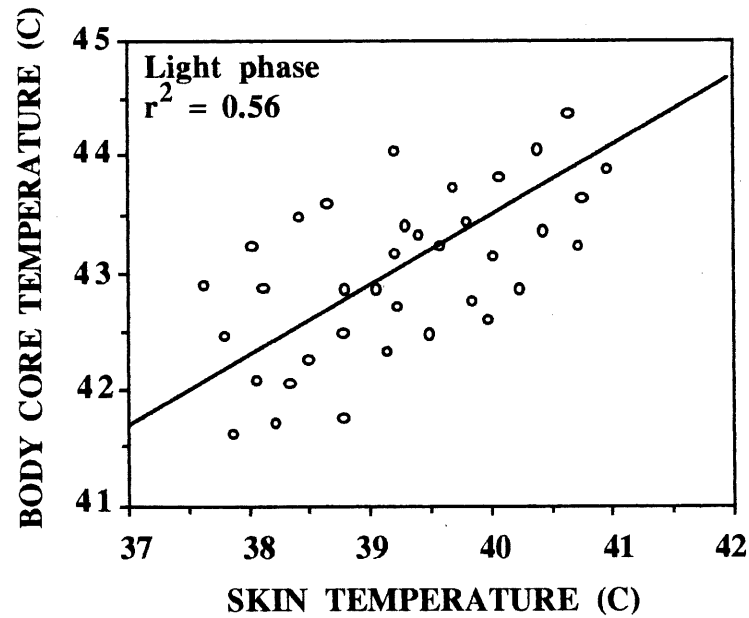


Fig. 5. Linear relationship between body core and skin surface temperatures recorded on the european starling (Fig. 4) (A) during the dark phase ($y = -1.08 + 1.06x$; $r^2 = 0.92$; $F_{34} = 408.5$; $P = 0.00011$) and (B) during the light phase ($y = 9.35 + 0.79x$; $r^2 = 0.56$; $F_{28} = 12.7$; $P = 0.037$).

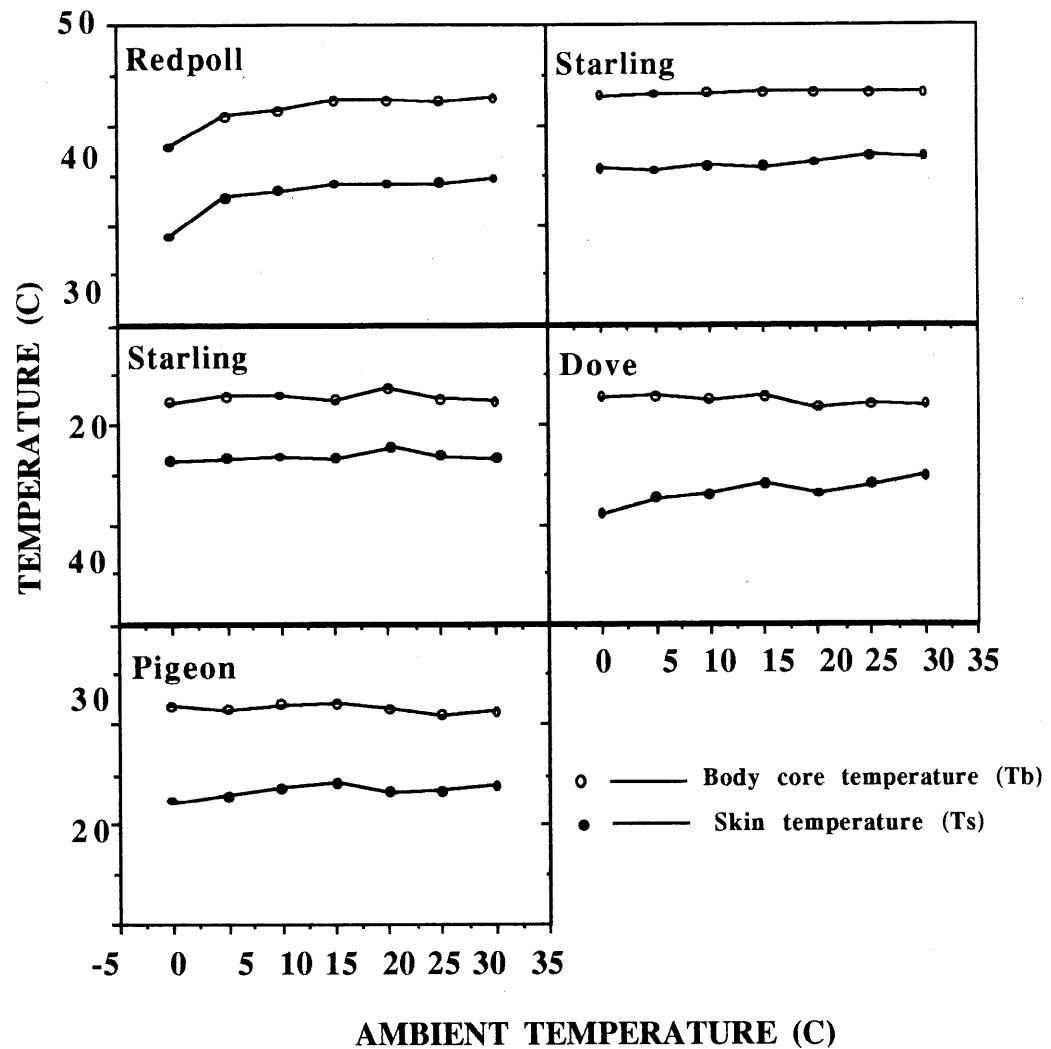


Fig. 6. Impact of ambient temperature and body size on the body core temperature (Tb) and skin temperature (Ts). A common redpoll (13 g), two european starlings (79 g and 82 g), a mourning dove (119 g), and a pigeon (355 g).were equipped with an external transmitter fixed on the jugular vein and an internal transmitter inserted in the abdominal cavity, opposite to the suture. Ambient temperature was decreased stepwise from 30 to 25, 20, 15, 10, 5, and 0 C, with a period of 90 min at each temperature. Measurements of body core and skin temperatures were recorded at 10-min intervals during the last 60 min. Each value represents the mean (n=10) body core and skin temperatures recorded at each ambient temperature level. SEM ranged between 1.0 C and 1.2 C, and so could not be resolved on this figure.

We investigated the effect of ambient temperature (T_a) and body weight on T_b and T_s , with a common redpoll (13 g), two european starlings (79 g and 82 g), a mourning dove (119 g), and a pigeon (355 g). Fig. 6 shows that T_b was not affected by T_a , except for the common redpoll who presented a significant decrease in both T_b ($r^2 = 0.76$; $F_3 = 12.92$, $P = 0.038$) and T_s ($r^2 = 0.85$; $F_3 = 22.24$, $P = 0.0092$) below 10 °C. On the other hand, T_s of larger birds, pigeon and dove, tended to decrease gradually with colder T_a , independently of T_b ($r^2 = 0.67$; $F_7 = 8.08$, $P = 0.047$). Thus T_b and T_s values are dependent upon T_a and body weight. Stepwise regression analysis of these results showed that avian T_b can be extrapolated from T_s using two relationships that take into account variations in body weight (BW) and (T_a). The two equations separate passerine from non-passerine birds:

Passerines: $(T_b - T_s) = 9.765 - 0.043 (BW) - 0.031 (T_a)$

$$r^2 = 0.77, P > 0.0001$$

Non-passerines: $(T_b - T_s) = 11.051 - 0.004 (BW) - 0.097 (T_a)$

$$r^2 = 0.85, P > 0.0001$$

DISCUSSION

In this work, we have demonstrated that a long-range external transmitter can be used to monitor avian body temperature. First, we established the best experimental conditions to compare skin temperature (T_s) and body core temperature (T_b). Among six different positions tested on red-winged blackbirds, the external transmitter fixed on the jugular vein was the least affected by the birds activities, with a mean variability in T_s of ± 1.25 C over 3 hrs. Second, although a recovery period of seven days was recommended for the insertion of a transmitter in birds abdominal cavity (Reinertsen 1982, Reinertsen and Haftorn 1984, Phillips and Berger 1991, Wiernusz and Teeter 1993), we report that T_b

was 1.12 C higher underneath the suture than on the opposite side of the abdomen. To avoid this artefact, we suggest that the incision should be practiced on one side (and not in the center) of the abdomen and the transmitter pushed to the opposite side in the cavity.

Under these conditions, a european starling exhibited a well-defined diurnal Tb cycle, with values between 39.95 C and 42.52 C during the dark phase and between 42.09 C and 43.75 C during the light phase (Reinertsen 1982, Reinertsen and Haftorn 1983, Prinzinger et al. 1991). An external transmitter fixed on the jugular vein provided a diurnal Ts cycle very similar to the Tb cycle, with a mean Tb-Ts difference of 4.23 ± 1.21 C. Significant relationships were established between Ts and Tb during both the dark phase ($r^2 = 0.92$) and the light phase ($r^2 = 0.56$), suggesting that an external transmitter can be used to monitor Tb. The larger spread of the values around the slope observed during the light phase could be produced by the birds activities. Sudden bursts of activity, such as flying, were shown to increase Tb by 2-3 °C (Bartholomew and Dowson 1954, Prinzinger et al. 1991).

While many bird species are insensitive to changes in ambient temperature (Ta), small passerines have adapted to cold nocturnal temperatures by entering either controlled hypothermia or torpor (Reinertsen 1983, Reinertsen and Haftorn 1986, Prinzinger et al. 1989). We demonstrated that an external transmitter fixed on the jugular vein can also be used to discriminate the impact of Ta on Tb according to the bird species. Body core temperature of two european starlings (79 g and 82 g), a dove (119 g), and a pigeon (355 g) were not affected by changes in Ta from 0 to 30 C, with means of 42.66 C, 41.54 C, 41.82 C and 41.56 C, respectively. This tendency for birds of lower body weight to express higher Tb during the active phase has been extensively reviewed (Prinzinger et al. 1991). Similar results were obtained for Ts, although a slight tendency to decrease below 10 C was noticed, as reported by Hohtola (1982) for pigeons' backskin temperature. In contrast, the common redpoll (14 g) presented a marked decrease in both Tb and Ts with increasing cold load, as previously reported by Reinertsen and Haftorn (1986). The stability of Tb reported for the larger birds suggests that they do not undergo controlled hypothermia. Nevertheless, numerous studies have shown that nocturnal Tb of pigeons (Graf et al. 1989, Phillips and Berger 1991), doves (Walker et al. 1983), and blackbirds

(Biebach 1977) fall to lower and lower levels on consecutive nights after the onset of food deprivation. But a low body temperature also implies a lower state of alertness and presumably a greater risk of being caught by predators. Consequently, these birds must regulate their metabolic rate in such a way as to maintain a certain level of alertness, while saving sufficient energy to survive the night, including the necessary re-emergence from the state of hypothermia in the morning (Reinertsen and Haftorn 1984).

From the results presented here, we identified two equations from which T_b can be extrapolated from T_s , taking into consideration individual body weight and changes in T_a : one for passerine and the other for non-passerine birds. Aschoff (1981) also reported different relationships between thermal conductance and body weight for passerine and non-passerine birds. Minimal thermal conductance was negatively correlated to body size and would depend on whether the individual was active or at rest. Minimal conductance measured during the active phase was estimated at 0.16-0.25 ml O_2 / g.h.C for the common redpoll (West 1972, Reinertsen and Haftorn 1986), 0.097 ml O_2 / g.h.C for the european starling, and 0.040-0.060 ml O_2 / g.h.C for pigeons (Lasiewski et al. 1967, Phillips and Berger 1991). Thus the thermoregulatory properties of the birds would divide them into two categories.

In conclusion, we provide a protocole and two mathematical relationships that will allow to use long-range external transmitters to monitor body core temperature in wildlife experiments. The external transmitter fixed dorsally on the jugular vein was shown to follow very closely any circadian changes in T_b , or decrease in T_b induced by cold load. Moreover, this technique has the advantage of avoiding any physiological or behavioral consequences of anesthesia and surgery, with minimum handling required to capture a bird and to fix an external transmitter with surgical glue. These findings should contribute to the expansion of our knowledges on avian thermoregulation.

LITTERATURE CITED

AD HOC AOU COMMITTEE. 1988. The use of wild birds in research. *Auk* 105:1A-39A.

- ASCHOFF, J. 1981. Thermal conductance in mammals and birds: its dependence on body size and circadian phase. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A:611-619.
- BARTHOLOMEW, G. A. Jr., AND W. R. DAWSON. 1954. Body temperature and water requirements in the mourning dove, Zenaidura macroura magginella. *Ecology* 35:181-187.
- BARTHOLOMEW, G. A., C. M. VLECK, AND T. L. BUCHER. 1983. Energy metabolism and nocturnal hypothermia in two tropical passerine frugivores, Manacus vitellinus and Pipra mentalis. *Physiol. Zool.* 56(3):370-379.
- BIEBACH, H. 1977. Reduktion des Energiestoffwechsels und der Körpertemperatur hungernder Amseln (Turdus merula). *J. Orn.* 118:294-300.
- GRAF, R., S. KRISHNA, AND H. C. HELLER. 1989. Regulated nocturnal hypothermia induced in pigeons by food deprivation. *Am. J. Physiol.* 256(25):R733-R738.
- HART, J. S., AND O. Z. ROY. 1967. Temperature regulation during flight in pigeons. *Am. J. Physiol.* 213:1311-1316.
- HISSA, R., AND W. RAUTENBERG. 1974. The influence of centrally applied noradrenaline on shivering and body temperature in the pigeon. *J. Physiol.* 238:421-435.
- HOHTOLA, E. 1982. Thermal and electromyographic correlates of shivering thermogenesis in the pigeon. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A:159-166.
- INOMOTO, T., AND E. SIMON. 1981. Extracerebral deep-body cold sensitivity in the Pekin duck. *Am. J. Physiol.* 241(10):R136-R145.
- LAM, S. K., AND S. HARVEY. 1990. Thyroid regulation of body temperature in anaesthetized chickens. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A(3):435-439.
- LASIEWSKY, R. C., W. W. WHEATHERS, AND M. H. BERNSTEIN. 1967. Physiological responses of the giant hummingbird, Patagona gigas. *Comp. Biochem. Physiol.* 23: 797-813.
- MACLEOD, M. G., A. WATSON, AND Y. SONODA. 1992. Thermogenic, thermolytic and body temperature effects of fenfluramine, a 5-hydroxytryptamine agonist, in the domestic fowl (Gallus domesticus). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A(2):213-220.
- MERKEL, F. W. 1958. Untersuchungen über tages-und jahresperiodische °Auderungen im Energiehaushalt gekäfigter Zugrögel. *Z. Vergl. Physiol.* 41:154-178.
- PHILLIPS, N. H., AND R. J. BERGER. 1991. Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. *J. Comp. Physiol. B* 161:311-318.

- PRINZINGER, R., I. LÜBBEN, AND K.-L. SCHUCHMANN. 1989. Energy metabolism and body temperature in 13 sunbird species (Nectariniidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 92A(3):393-402.
- PRINZINGER, A., A. PREBMAR, AND E. SCHLEUCHER. 1991. Mini Review. Body temperature in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A:499-506.
- REINERTSEN, R. E. 1980. A telemetry study on deep body temperature of the willow tit (Parus montanus). *Acta Physiol. Scand* 108:32A.
- REINERTSEN, R. E. 1982. Radio telemetry measurements of deep body temperature of small birds. *Ornis Scand.* 13:11-16.
- REINERTSEN, R. E. 1983. Nocturnal hypothermia and its energetic significance for small birds living in the arctic and subarctic regions. A review. *Polar Res.* 1:264-284.
- REINERTSEN, R. E., AND S. HAFTORN. 1983. Nocturnal hypothermia and metabolism in the willow tit Parus montanus at 63 N. *J. Comp. Physiol.* 151:109-118.
- REINERTSEN, R. E., AND S. HAFTORN. 1984. The effect of short-time fasting on metabolism and nocturnal hypothermia in the willow tit Parus montanus. *J. Comp. Physiol. B* 154:23-28.
- REINERTSEN, R. E., AND S. HAFTORN. 1986. Different metabolic strategies of northern birds for nocturnal survival. *J. Comp. Physiol. B* 156:655-663.
- RUTLEDGE, J. T. 1974. Circannual rhythm of reproduction in male european starlings (Sturnus vulgaris). in E. T. Pengelly, ed. *Circannual Clocks*. Academic Press, New York.
- SCHMIDT, I., and E. SIMON. 1979. Interaction of behavioral and autonomic thermoregulation in cold exposed pigeons. *J. Comp. Physiol.* 133:151-157.
- VEGHTE, J. H. 1964. Thermal and metabolic responses of the gray jay to cold stress. *Physiol. Zool.* 37:316-328.
- WAITE, T. A. 1991. Nocturnal hypothermia in gray jays Perisoreus canadensis wintering in interior Alaska. *Ornis. Scand.* 22:107-110.
- WALKER, L. E., J. M. WALKER, J. W. PALCA, AND R. J. BERGER. 1983. A continuum of sleep and shallow torpor in fasting Doves. *Science* 221:194-195.
- WARKENTIN, I. G., AND N. H. WEST. 1990. Impact of long-term captivity on basal metabolism in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 96A(3):379-381.
- WEST, G. C. 1962. Responses and adaptations of wild birds to environmental temperature. Pages 291-333 in J. P. Hannon and E. G. Viereck, eds. *Comparative*

physiology of temperature regulation. Part 3. Fort Wainwright, Alaska: Arctic Aeromed. Lab.

WEST, G. C. 1972. The effect of acclimation and acclimatization on the resting metabolic rate of the common redpoll. *Comp. Biochem. Physiol.* 43:293-310.

WIERNUSZ, C. J. AND R. G. TEETER. 1993. Feeding effects on broiler thermobalance during thermoneutral and high ambient temperature exposure. *Poultry Sci.* 72:1917-1924.

ZAR, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, NJ, 718pp.

CHAPITRE 5

IMPACT DU DIMÉTHOATE SUR LE RYTHME CIRCADIEN DE TEMPÉRATURE CORPORELLE DE L'ÉTOURNEAU SANSONNET (*STURNUS VULGARIS*)

Plusieurs études sur les effets physiologiques d'une exposition aux OPs montrent des modifications de la thermorégulation (Myers 1987, Kozar *et al.* 1976, Murphy 1969). Cependant, les perturbations étudiées sont surtout centrées sur l'hypothermie qui survient quelques heures après une intoxication aux OPs. Une étude axée sur l'ensemble du cycle circadien de thermorégulation pourrait nous révéler la possibilité que d'autres aspects soient modifiés par une exposition aux OPs. Nous avons vu que le cycle d'activité est passablement perturbé suite à une exposition à un anticholinergique (chapitres 1 et 2). Les perturbations des rythmes circadiens d'activité s'expliquent par l'inhibition de l'AChE qui provoque un blocage de la transmission nerveuse dans le complexe hypothalamique, centre régulateur des rythmes circadiens. Le cycle thermorégulateur étant lui aussi régularisé par l'hypothalamus, il devient alors très probable qu'il soit également perturbé dans son ensemble, tel que le cycle d'activité. De plus, puisque l'activité est l'un des paramètres qui modulent la température corporelle, il est alors possible que l'on puisse observer des modifications du cycle de température similaires à celles du rythme d'activité. Les évidences actuelles démontrant l'hypothermie consécutive à une exposition aux OPs suggèrent des modifications plus profondes du rythme de température corporelle.

Avec les résultats du chapitre précédent démontrant la capacité de monitorer les variations de cycle de température avec un émetteur cutané, il devient alors possible d'étudier les effets d'un OP sur le cycle de température pendant 24 heures consécutives. Certains auteurs ont démontré l'effet de la température ambiante sur l'inhibition de l'AChE et l'amplitude de l'hypothermie consécutive à une intoxication aux OPs (Maguire et Williams 1987b, McDuff 1995). Ici, nous allons suivre les fluctuations de la température corporelle en intégrant des expositions plus ou moins aiguës de diméthoate combinées à des températures environnementales différentes.

RÉSUMÉ

Les organophosphorés (OPs) représentent la classe de pesticides la plus utilisée sur les sols de forêts et de fermes. Cependant, plusieurs espèces non visées sont victimes d'intoxication aux OPs. Dans cette étude, nous avons montré que des doses de diméthoate équivalentes à 1/18, 1/6 or 1/2 de la dose létale médiane (DL₅₀) modifient plusieurs paramètres du rythme circadien de température de l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) sous une photopériode L12:N12. La période du cycle fluctue davantage autour de 24 hrs \pm 2 hrs chez les oiseaux exposés au pesticide comparativement à 24 hrs \pm 1 hr chez les oiseaux contrôles. Le diméthoate induit aussi une diminution de l'amplitude de l'oscillation jour-nuit de température, dont la majeure partie se traduit par une augmentation de la température moyenne nocturne. D'autre part, nous rapportons que le degré d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) cérébrale par le pesticide augmente avec une diminution de l'amplitude de l'oscillation du cycle et avec une augmentation de la température moyenne nocturne. Ces résultats suggèrent que la température corporelle pourrait être utilisée pour évaluer le niveau d'exposition aux OPs chez les espèces non visées.

Reproduction de l'article soumis sous le titre de:

BRUNET, R. and J. MCDUFF. Impact of dimethoate on the circadian cycle of body temperature of european starling (*Sturnus vulgaris*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology (accepté, mai 1997).

Note: Le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Julie McDuff a également participé aux expériences et aux analyses ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Dimethoate is an organophosphorus pesticide currently sprayed on farmlands, forests and domestic gardens. A single exposure to a dose equivalent to either 1/18, 1/6 or 1/2 of the LD₅₀ profoundly disturbed the circadian cycle of temperature of European starlings (*Sturnus vulgaris*). Variability of the period around 24 hrs was increased by dimethoate, with 24 ± 1 hr and 24 ± 2 hrs for the control and treated birds, respectively. Dimethoate also induced a dose-dependent decrease in the range of day-night temperature oscillation, which was mostly described by an increase in mean overnight temperature. A reduction in the range of day-night temperature oscillation and the increase in mean overnight temperature were correlated to a decrease in brain acetylcholinesterase (AChE) activity. These two relationships demonstrated that while mortality occurred over a wide range of AChE inhibition, the birds chances of survival are expected to be drastically reduced if the range of day-night temperature is decreased by more than 7%, or if the mean overnight temperature is increased by more than 4%. These results suggest that monitoring of avian body temperature could be used to efficiently discriminate between different levels of OPs intoxication and to evaluate risks of mortality.

INTRODUCTION

Organosphosphates (OPs) represent a good proportion of all pesticides sold commercially in industrial countries (Gallo and Lawryk 1991). They are less persistent in the environment, less harmful and more rapidly metabolized by homeotherms than organic chlorine pesticides (Eto 1974; Smith 1987; Cairns *et al.* 1991). Nevertheless non-target species including mammals, fishes and birds are frequently injured by OPs (Smith 1987; Stanley and Fletcher 1981; Mineau et Peakall 1987; Greig-Smith *et al.* 1990). All OPs act on the metabolism by inhibiting the activity of cholinesterases, leading to an accumulation of acetylcholine (ACh) in the central and peripheral nervous systems (O'Brien 1967; Corbett 1974). For this reason, measurements of brain or plasma acetylcholinesterase (AChE) activity have been widely used to document the effects of sublethal doses of OPs on non-target species (review: Mineau 1991). Brain AChE inhibition was found proportional to the dose of OPs ingested under controlled conditions (Maguire and

Williams 1987; Hahn *et al.* 1991; Satyadevan *et al.* 1993). A 50% depression in brain AChE activity was suggested as a diagnostic of anti-cholinesterase induced death (Ludke *et al.* 1975), whereas 20% inhibition was judged sufficient to confirm an exposure to OPs (Zinkl *et al.* 1981).

Although AChE inhibition was proven to be a reliable tool to estimate OPs toxicity in laboratory experiments, our understanding of OPs toxicity on animals collected in the field suffers from a lack of consistencies between measurements of AChE, exposure and survival. AChE inhibition was shown to vary among tissue (Silver 1974), with age (Westlake *et al.* 1983) and the reproductive status of the individual (Hill and Murray 1987), and with the environmental temperature (Rattner 1982; Rattner and Franson 1984; Rattner *et al.* 1987; Maguire and Williams 1987). Moreover, continuous monitoring of physiological cues after pesticide exposure would provide valuable informations, which cannot be gained with AChE activity without stressing the individual by regular capture and blood sampling. Thus other possible candidates must be considered to monitor the impact of OPs on non-target species in the field.

Circannual and circadian rhythms are also under the influence of ACh-mediated neurotransmissions. Rhythms of activity of three granivorous bird species were disrupted after they ingested seeds contaminated with dimethoate (Brunet and Cyr 1992). We also noted changes in the activity level of Red-winged blackbirds after ingestion of a sublethal dose of dimethoate (Brunet *et al.* 1996a) or alpha-chloralose, another cholinergic inhibitor (Brunet *et al.* 1996b). The fact that OPs induce hypothermia in birds (Rattner and Franson 1984; Brunet *et al.* 1994) suggests that circadian cycles of body temperature could also be affected by OPs. In this study, we investigated the impact of dimethoate on the circadian cycle of body temperature of European starlings. Their body temperature was monitored with external telemetry transmitters (Brunet *et al.* 1996c) during 24 hrs before and after ingestion of dimethoate (1/18, 1/6 or 1/2 of LD₅₀), at various ambient temperatures (-5 to 35 °C). Results suggest that telemetry monitoring of circadian changes in body temperature may constitute very sensitive tools to study OPs intoxication.

MATERIALS AND METHODS

Experimental birds

A total of 210 European starlings were captured with a canon net and kept in large aviaries for at least one month before the experiments to allow acclimatization (Ad Hoc AOU Committee 1988), but no longer than three months to avoid changes in basal metabolism and body temperature (Warkentin and West 1990). During this period, they were fed *ad libitum* with cracked corn and mixed seeds commercially prepared for wild birds. Vitamins and minerals were added to drinking water. Relative humidity was $50 \pm 5\%$, temperature 15.0 ± 2.0 °C and illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux).

Experimental procedures

The birds were equipped with an external transmitter (1.8 g, Holohill) fixed with surgical glue dorsally at the base of the neck, after removing feathers and down (Brunet *et al.* 1996c), then they were transferred to individual cages (0.6 x 0.6 x 0.6 m) within an experimental chamber. Each cage was equipped with a perch, as well as food and water in sufficient amount to last the whole experiment. Relative humidity was maintained at $50 \pm 5\%$, illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux) and ventilation at 1.5 l/min. Only adult birds were used because the basal level of brain AChE activity was shown to differ in younger birds (Gard and Hooper 1993). But since brain AChE activity was shown not to be sex-related (Yawetz *et al.* 1979; Niethammer and Baskett 1983; Hill and Murray 1987), both males and females were randomly assigned to the cages. Sex was determined by the length of the feathers on their thorax, according to the criteria established by Pyle *et al.* (1987).

Skin surface temperature (T_s) was measured during 24 hrs before the beginning of the experiment. Then at the onset of the following light phase, the birds were exposed to a single dose of dimethoate injected directly into their crop with a canulated syringe. Three

concentrations of pesticide were tested, 1.76, 5.27 or 15.80 mg/kg, which would correspond to 1/18, 1/6, and 1/2 of the LD₅₀ estimated for European starlings (Schafer *et al.* 1983). Dilutions were prepared in distilled water with dimethoate (Cygon 2E®), sold commercially as a 24.9 % active solution. Radvanyi *et al.* (1986) have demonstrated that the solvent in which dimethoate is manufactured does not in itself inhibit the activity of brain AChE. After 24 hrs of Ts monitoring, the birds were sacrificed and their brain immediately frozen in liquid nitrogen. They were kept at -80 °C until the levels of AChE activity were assayed according to the technique of Ellman *et al.* (1961) modified by Hill and Fleming (1982). Each experiment was performed with 9 treated birds, and 8 control birds that received distilled water instead of dimethoate. The birds Ts was recorded every 10 min and mean values per hour were used in the analyses. The effect of ambient temperature on the toxicity of dimethoate was tested by performing this experiment at -5, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C.

Data analysis

Kruskal-Wallis tests were used to detect any effect of ambient temperature on the characteristics of the circadian cycle of body temperatures of control and treated birds (the period, the range of day-night Ts, the mean overnight Ts and the time to reach minimum overnight Ts). The effect of the different doses of dimethoate on these parameters were compared by a Kruskal-Wallis test, followed if necessary by a Mann-Whitney U tests for small sample size. Regression analyses were performed between each parameter and brain AChE activity (Zar 1984).

RESULTS

European Starlings exhibited well-defined circadian rhythms of skin temperature (Ts), with 42.15 - 43.55 °C during the light phase and 39.72 - 42.48 °C during the dark phase. Figure 1 illustrates how a single dose of dimethoate, administered at the onset of the light phase, affected the birds thermoregulation throughout the cycle. Hypothermia occurred about 2 hrs after ingestion and lasted 2 to 4 hrs. The remaining of the light phase was

spent at slightly higher T_s than on the preceding day, and high T_s persisted several hours after the lights were turned off. Finally, the dark phase showed large variations in T_s . We analysed the impact of dimethoate on each parameter of the daily T_s cycle, and at ambient temperatures ranging between $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

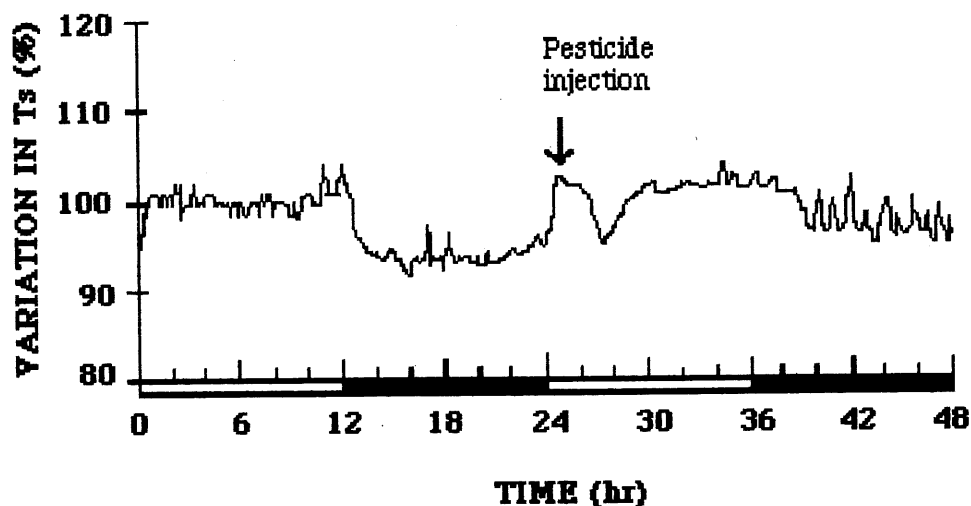


Fig. 1. Typical daily cycle of body temperature ($^{\circ}\text{C}$) of European Starlings recorded before and after ingestion of dimethoate. Measurements were expressed as percentage of the mean body temperature recorded during the light phase of the 24-hr period that preceded the experiment. Pesticide ingestion occurred within the first 10 min of the light phase on the second day of experiment. T_s measurements were taken every 10 min and dark periods of the 12:12 LD cycle are indicated by the black bars on the abscissa.

Ambient temperature (T_a) influenced the time required to reach minimum overnight temperature (Figure 2). During the second dark phase, control birds required more time to reach minimum overnight temperature at T_a higher than $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, and less time at T_a

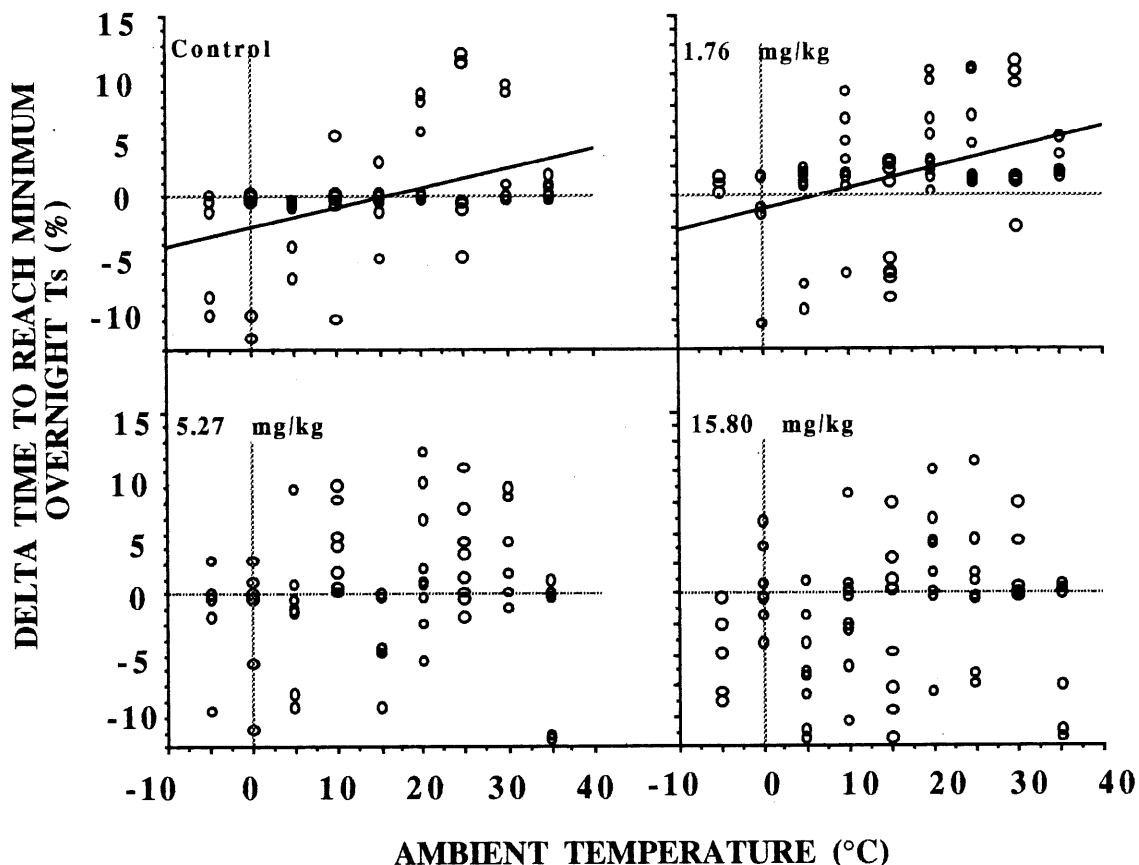


Fig. 2. Relationship between ambient temperature (°C) and the difference in time required to reach minimum overnight Ts (°C) recorded the night before and after pesticide ingestion. (A) 0 mg/kg, (B) 1.76 mg/kg, (C) 5.27 mg/kg and (D) 15.80 mg/kg dimethoate. Equations: (A) $y = 0.16 - 2.38x$, $R^2 = 0.18$; $F = 15.63$, $P = 0.0002$. (B) $y = 0.15x - 2.19$, $R^2 = 0.16$; $F = 13.39$, $P = 0.0005$. (C) $y = 0.064x - 0.86$, $R^2 = 0.02$; $F = 1.79$, $P = 0.19$. (D) $y = 0.09x - 2.77$, $R^2 = 0.04$; $F = 2.57$, $P = 0.11$.

lower than 15 °C, than during the first dark phase ($R^2 = 0.18$; $F = 15.63$, $P = 0.0002$). Because the birds were kept in aviaries 1-2 months at 15 °C, experiments performed at higher or lower T_a required for them to acclimatize. Dimethoate however impaired the capacity of the birds to adjust to the new conditions, since a relationship was only present when the birds were treated with the lowest dose, corresponding to 1/18 of LD_{50} ($R^2 =$

0.16; $F = 13.39$, $P = 0.0005$). Since T_a did not influence the response of the other parameters to dimethoate, all data were pooled together in the following analyses.

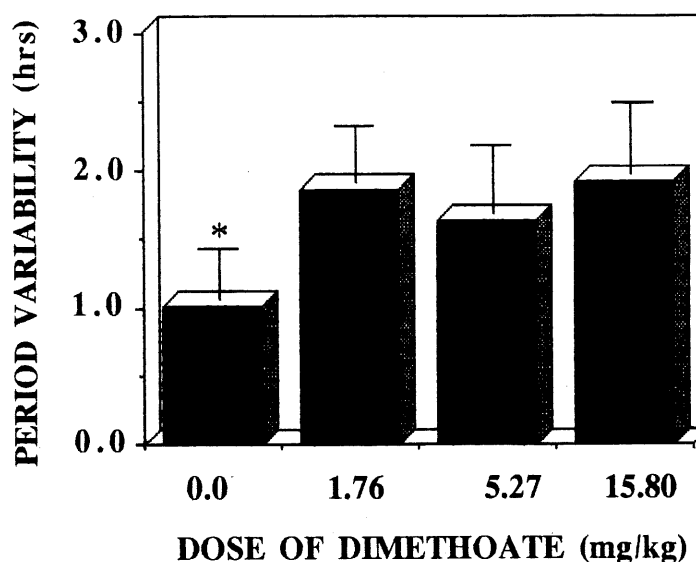


Fig. 3. Impact of dimethoate on the period of the temperature cycle. Values were expressed as variability around 24 hrs, measured on the day of treatment. Control birds received water instead of dimethoate. Since the period was not affected by the ambient temperature, all data were pooled together. Each bar represents the mean \pm SEM ($N_0 = 81$, $N_{1.76} = 77$, $N_{5.27} = 75$, $N_{15.80} = 72$). * $P < 0.01$.

Dimethoate caused an increase in variability of the period of the temperature cycle from 24 hrs (Figure 3). The period of the control birds was maintained at 24 ± 1 hr after water ingestion, compared to 24 ± 2 hrs for the birds exposed to the pesticide, independently of the dose of dimethoate (1.76 mg/kg: $Z = -3.46$, $P = 0.0005$; 5.27 mg/kg: $Z = -3.17$, $P = 0.0015$; 15.80 mg/kg: $Z = -4.79$, $P = 0.0001$). In contrast, the range of day-night oscillation in T_s was affected by dimethoate in a dose-dependent manner (Figure 4). Before pesticide exposure, there was no significant difference among the four groups of birds, with an average of 2.4 ± 1.4 °C. The range of day-night T_s of the control birds

slightly increased the second day, as expected from non-acclimatized birds. In contrast, dimethoate induced a clearly dose-dependent decrease in oscillation amplitude (0-1.76 mg/kg: $Z = -3.67$, $P = 0.0002$; 0-5.27 mg/kg: $Z = -6.56$, $P = 0.0001$; 0-15.80 mg/kg: $Z = 7.55$, $P = 0.0001$; 1.76-5.27 mg/kg: $Z = -2.57$, $P = 0.01$; 1.76-15.80 mg/kg: $Z = -4.35$, $P = 0.001$; 5.27-15.80 mg/kg: $Z = -2.34$, $P = 0.02$). Nocturnal Ts were responsible for more than 80% of the reduction in Ts oscillation amplitude. The mean overnight Ts of the control Starlings was lower on the second dark phase (Figure 5). In contrast, dimethoate induced a significant increase in mean overnight Ts, which was not dose-dependent (1.76 mg/kg: $Z = -2.65$, $P = 0.008$; 5.27 mg/kg: $Z = -2.77$, $P = 0.006$; 15.80 mg/kg: $Z = -2.05$, $P = 0.004$).

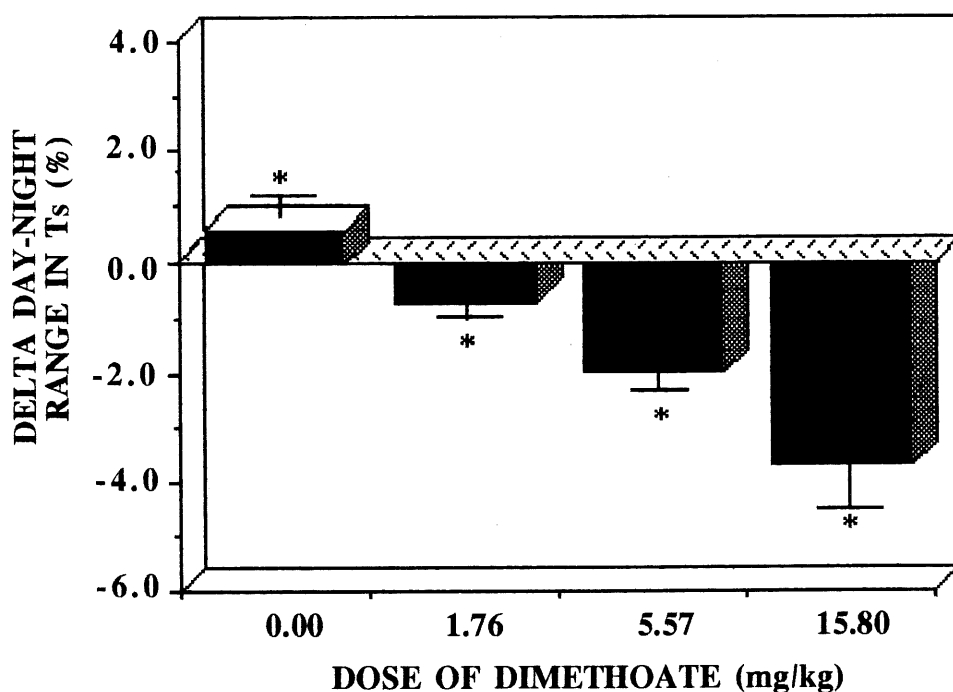


Fig. 4. Impact of dimethoate on the difference between the range in day-night Ts recorded the day after and before pesticide ingestion. Control birds received water instead of dimethoate. Since values were not affected by the ambient temperature, all data were pooled together. Each bar represents the mean \pm SEM ($N_0 = 81$, $N_{1.76} = 77$, $N_{5.27} = 75$, $N_{15.80} = 72$). * $P < 0.02$.

A linear relationship was established between the range in day-night Ts and brain AChE activity (Figure 6). The reduction in the range of day-night Ts caused by dimethoate was correlated to a decrease in brain AChE activity ($R^2 = 0.21$, $F = 78.15$, $P = 0.0001$). This figure also indicates that although mortality occurred over a wide range of percent AChE inhibition, percent mortality increased from 0% to 60% over a 5% to 7.5% decrease in the

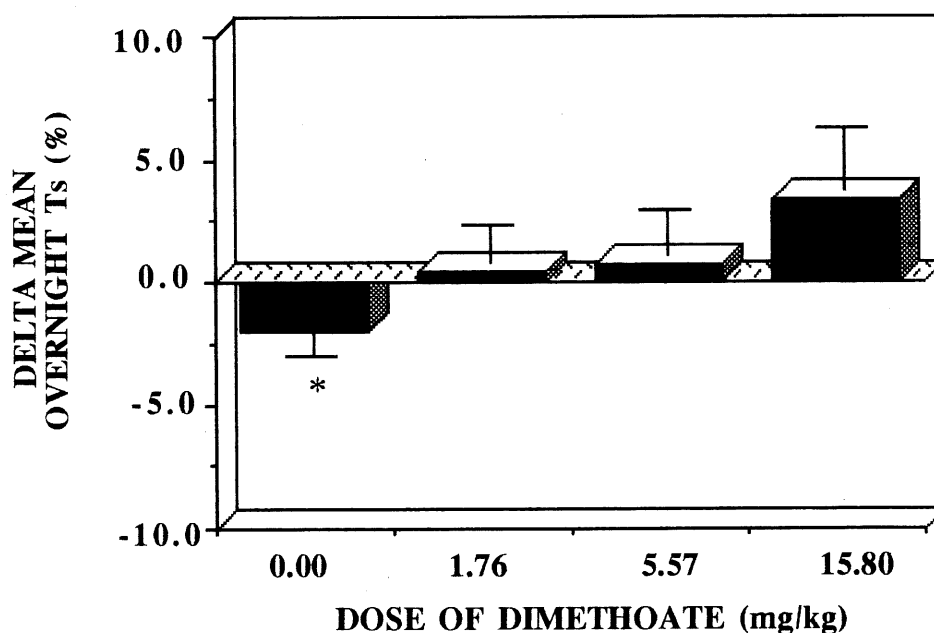


Fig. 5. Difference between the mean overnight Ts measured the day after and before pesticide ingestion. Control birds received water instead of dimethoate. Since this parameter was not affected by the ambient temperature, all data were pooled together. Each bar represents the mean \pm SEM ($N_0 = 81$, $N_{1.76} = 77$, $N_{5.27} = 75$, $N_{15.80} = 72$). * $P < 0.01$.

range of day-night Ts. A similar relationship was established between mean overnight Ts and brain AChE activity (Figure 7). The lower the brain AChE activity, the higher the mean overnight Ts. ($R^2 = 0.32$, $F = 14.19$, $P = 0.0001$). And again, death occurred over a wide range of AChE activity, but mortality frequency passed from 10% to 57% when mean overnight Ts increase passed from 4% to 5%. These two relationships indicate that parameters of avian temperature could be very efficient to study the chances of survival of exposed birds in field experiments.

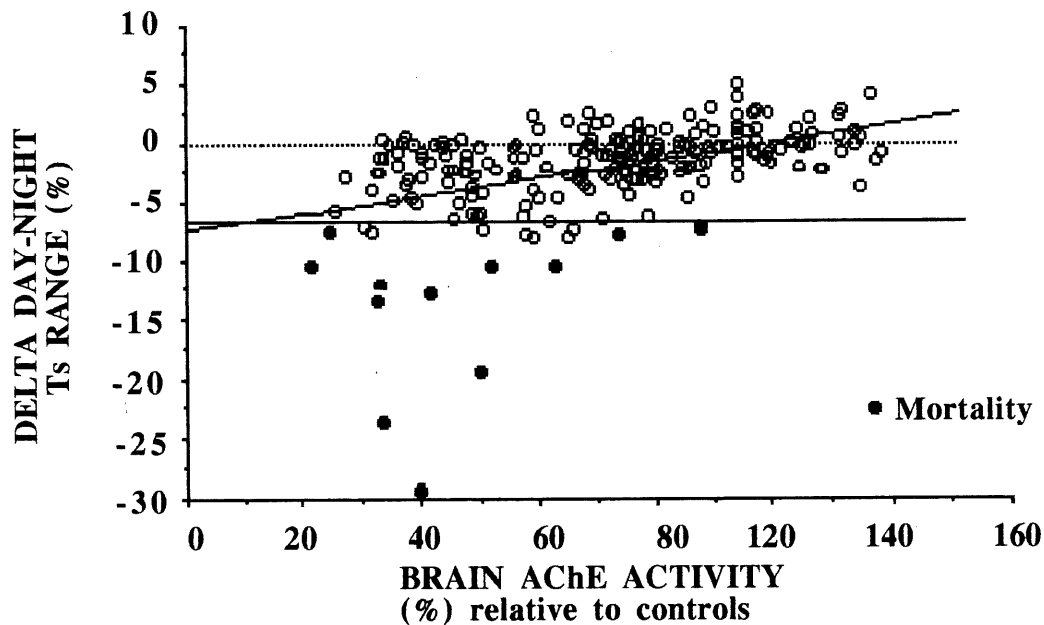


Fig. 6. Relationship between brain AChE inhibition and the difference in range of day-night Ts recorded the day after and before pesticide ingestion. AChE activity was expressed as % relative to the mean activity of all 8 control birds, taken as 100%. $y = 0.072x - 7.526$. $R^2 = 0.21$; $F = 78.15$, $P = 0.0001$. The solid bar indicates that mortality started to occur when the range in day-night Ts was reduced by more than 6%.

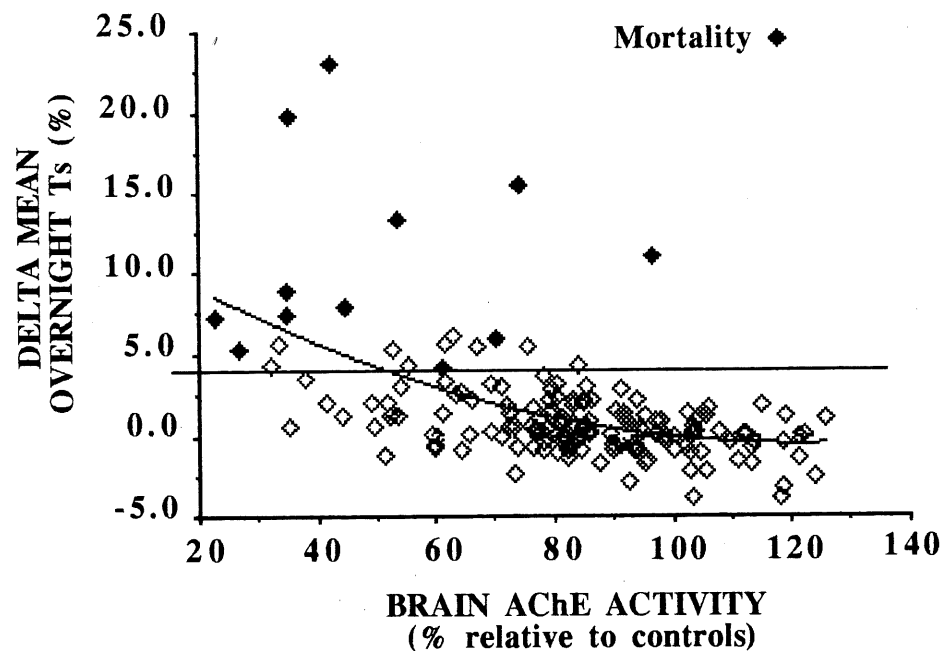


Fig. 7. Relationship between the difference in mean overnight Ts recorded the day after and before pesticide ingestion and brain AChE inhibition. AChE activity was expressed as % relative to the mean activity of all 8 control birds, taken as 100%. Solid bar indicates the occurrence of death for an increase in mean overnight Ts of more than 4%. $R^2 = 0.11$; $F = 14.18$, $P = 0.0001$.

DISCUSSION

We have demonstrated that dimethoate disrupts the circadian cycle of body temperature of European starlings. The birds experienced hypothermia few hours after intoxication, as previously reported for this OP (Brunet *et al.* 1994; McDuff 1995) and others (Rattner and Franson 1984). Variation of the period around 24 hrs increased from ± 1 hr to ± 2 hrs with dimethoate, independently of the dose of dimethoate. In most cases, body

temperature remained elevated several hours after the lights were turned off. This change in period suggests that the birds were desynchronized from their environment. Granivorous bird species experienced changes in the period and distribution of daily activities as well as a reduction in activity level after feeding on seeds contaminated with dimethoate (0.24 g/m² seeds) (Brunet and Cyr 1992).

Dimethoate also caused a dose-dependent reduction in the range of day-night oscillation in Ts. The mean Ts of the light phase and the dark phase were both affected by the pesticide. Diurnal hypothermia was responsible for a decrease in mean Ts during the light phase, which was estimated to account for about 20 % of the reduction in Ts day-night range. The remaining 80% were caused by several modifications of the birds thermoregulation during the dark phase. First, since the birds Ts remained around daily values several hours after the lights were turned off, higher Ts values were included in the calculations of the mean overnight Ts. Second, the night that followed OP intoxication was characterized by large variations in Ts throughout the night phase, with sudden increases in Ts close to diurnal values. Karczmar (1984) reported that AChE inhibitors modify the EEG and REM patterns of sleep. Another symptom of OPs intoxication in birds is diarrhea (Kozar et al. 1976; Grue 1982), which could wake them up frequently, and thus induce short-term increases in Ts.

Two relationships were established between brain AChE activity and the birds thermoregulation. A reduction in Ts amplitude and an increase in mean overnight Ts were correlated to a decrease in brain AChE activity. We also report that mortality was encountered for percent AChE inhibition ranging between 0 and 80%. In contrast, risks of mortality increased rapidly if the day-night Ts range decreased by more than 5%, or if the mean overnight Ts increased by more than 4%. For a mean value of 38 °C, a 4% increase in Ts represents a rise of 1.5 °C, which is considerable for avian body temperature. If the birds are not immediately killed by the pesticide, their survival would be expected to depend largely on their energy reserves (review: Prinzinger *et al.* 1991). The metabolic cost associated to their frequent rewarming during the night that follows exposure might become too important for them to recover daytime Ts in the morning, especially for small birds having low energy reserves

Ambient temperature (T_a) was shown to affect differently the light phase and the dark phase of the circadian cycle of temperature. Mean diurnal T_s of control birds was not affected by changes in T_a between -5 and 35 °C. In contrast, a single dose of dimethoate induces diurnal hypothermia, which was shown to be more pronounced at colder T_a (McDuff 1995). Here we report that dimethoate also causes the disappearance of a relationship between T_a and the time required to reach minimum overnight T_s . Control birds required less time to reach minimum overnight temperature with decreasing T_a , probably to save metabolic energy. This relationship remained only significant for the birds treated with the lowest dose of dimethoate, corresponding to $1/18$ of LD_{50} (Schafer *et al.* 1983). The time to reach minimum overnight temperature was not affected at 15 °C, which corresponds to the T_a at which the birds were kept in the aviary before the experiments. Consequently, the fact that the control birds took more time to reach minimum overnight T_s on the second night at T_a above 15 °C, and less time at T_a below 15 °C could be explained by the fact that they were not acclimatized.

In conclusion, we have demonstrated that dimethoate modifies several parameters of circadian rhythms of body temperature. Although this study examined only the first 24 hrs after pesticide ingestion, other studies suggest that circadian rhythms of body temperature could be affected much longer. For instance, circadian rhythms of activity of Red-winged blackbirds took at least a week to recover from doses of dimethoate as low as 0.96 mg/kg (Brunet *et al.* 1996a). Thus, although visual signs of intoxication such as lethargy, vomiting and incoordination disappear within 24 hrs after intoxication to OPs (Hudson *et al.* 1984), circadian rhythms of activity and body temperature suggest that the physiological impact of OPs takes several days to disappear after pesticide exposure. Enzyme assays indicate that birds eliminate OPs within hours (O'Brien and Yamamoto 1970). However, brain AChE activity of several bird species including the European starling were shown to take in average 26 days to recover after being depressed by 55% to 64% with oral doses of dicotophos (Flemming and Grue 1981). Thus circadian rhythms could be used as sensitive tools to detect and study OPs intoxication. Among the known types of circadian rhythms, the diurnal cycle of body temperature would be a practical choice for monitoring the effects of OPs. The range in day-night oscillation in

Ts and the mean overnight Ts could be used to efficiently discriminate and evaluate risks OPs exposure.

LITTERATURE CITED

- AOU (American Ornithologist Union) (1988) Report of the *Ad Hoc* committee on the use of wild birds in research. Auk Suppl 105:1a-39a
- Brunet R, Cyr A (1992) The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. Agric Ecosyst Environ 41:327-336
- Brunet R, Mineau P, Daoust G, Gauthier G (1994) Évaluation sur le terrain du suivi de la température corporelle pour détecter une intoxication du Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) au chlorpyrifos. Service canadien de la faune. Hull. KA 168-2-1033. 81 p.
- Brunet R, Girard C, Cyr A (1996a) Comparative study on the signs of intoxication and changes in activity level of Red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. Agric Ecosyst Environ (submitted)
- Brunet R, Caza N, Cyr A (1996b) Food intake of circadian rhythms of activity of Red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). A time-course study on the effects of alpha-chloralose and secobarbital. J Biol Rhythms (in press)
- Brunet R, Dumais J, Thomas DW (1996c) Improved method for monitoring avian body temperature. J Wildl Manage (submitted)
- Cairns MA, Maguire CC, Williams BA (1991) Brain cholinesterase activity of bobwhite acutely exposed to chlorpyrifos. Environ Toxicol Chem 10:657-664
- Corbett JR (1974) The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, New York.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88-95
- Eto M (1974) Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. CRC Press, Cleveland, Ohio
- Flemming WJ, Grue CE (1981) Recovery of AChE activity in 5 avian species exposed to dicotophos, an OP pesticide. Pest Biochem Physiol 16:129-135

- Gallo MA, Lawryk NJ (1991) Organic phosphorous pesticides. In: Hayes WJ Jr and Laws ER (eds) Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, Toronto, p 917
- Gard NW, Hooper MJ (1993) Age dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of Eastern bluebirds and European starlings. J Wildl Dis 29:1-7
- Greig-Smith PW, Fletcher MR, Hunter K, Quick MP, Ruthven AD, Shaw IC (1990) Pesticide poisoning of animals 1988: Investigations of suspected incidents in Great Britain. Report of the Environmental panel of the advisory committee on pesticides. MAFF, London
- Grue CE (1982) Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. Arch Environ Contam Toxicol 11:617-626
- Hahn T, Ruhnke M, Lupp H (1991) Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by the organophosphorus insecticide methylparathion in the central nervous system of the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Acta Histochemn 91:13-19
- Hill EF, Fleming WJ (1982) Anticholinesterase poisoning in birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. Environ Toxicol Chem 1:27-38
- Hill EF, Murray HC (1987) Seasonal variation in diagnostic enzymes and biochemical constituents of captive Northern bobwhites and passerines. Comp Biochem Physiol 87B:933-940
- Hudson RH, Tucker RK, Haegele MA (1984) Handbook of toxicology of Interior, Fish and Wildlife Service, Res. Publ. 153, Washington DC
- Karczmar AG 1984 Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. Fund Appl Toxicol 4:S1-S17
- Kozar MD, Overstreet DH, Chippendale TC, Russell RW (1976) Changes of acetylcholinesterase activity in three major brain areas and related changes in behaviour following acute treatment with diisopropyl fluorophosphate. Neuroph 15:292-298
- Ludke JL, Hill EW, Dieter EF (1975) Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. Arch Environ Contam Toxicol 3:1-21
- Maguire CC, Williams BA (1987) Cold stress and acute organophosphorus exposure: interaction effects on juvenile Northern bobwhite. Arch Environ Contam Toxicol 16:477-481
- McDuff J (1995) L'influence de la temperature environnementale sur la temperature corporelle et l'acetylcholinesterase cerebrale de l'Étourneau sansonnet (*Sturnus*

- vulgaris*) exposé au diméthoate. Masters thesis, Department of Biology, Sherbrooke University
- Mineau P (1991) Difficulties in the regulatory assessment of cholinesterase-inhibiting insecticides. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides. Elsevier, New York, p 278
- Mineau P, Peakall DB (1987) An evaluation of avian impact assessment techniques following broad-scale forest insecticide sprays. *Environ Toxicol Chem* 6:781-791
- Niethammer KR, Baskett TS (1983) Cholinesterase inhibition of birds inhaling wheat fields treated with methyl parathion and toxaphene. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:471-475
- O'Brien RD (1967) Insecticides: Action on metabolism. Academic Press, New York
- O'Brien RD, Yamamoto I (1970) Biological toxicology of insecticides. Academic Press, New York
- Prinzinger A, Prebmar A, Schleucher E (1991) Mini Review. Body temperature in birds. *Comp Biochem Physiol* 99A:4 99-506
- Pyle P, Howell SNG, Yunick RP, Desante DF (1987) Identification guide to North American passerines. Slate Creek Press, Bolinas
- Radvanyi A, Kroeger P, Busby DG, Shaw GG (1986) Response of quail, pheasants and sparrows to one oral dose of dimethoate and to consumption of dimethoate treated bran baits. *Bull Environ Contam Toxicol* 36:616-621
- Rattner BA (1982) Diagnosis of anticholinesterase poisoning in birds: effects of environmental temperature and underfeeding on cholinesterase activity. *Environ Toxicol Chem* 1:329-335
- Rattner BA, Franson JC (1984) Methyl parathion and fenvalerate toxicity in American kestrel *Falco sparverius* : acute physiological responses and effects of cold. *Can J Physiol Pharmacol* 62:787-792
- Rattner BA, Becker JM, Nakatsugawa T (1987) Enhancement of parathion toxicity to quail by heat and cold exposure. *Pestic Biochem Physiol* 27:330-339
- Satyadevan S, Kumar S, Tembhre M (1993) Acetylcholinesterase activity and enzyme kinetics in the brain of Common carp *Cyprinus carpio* subjected to sublethal exposure to dimethoate. *Biosci Biotech Biochem* 57(9):1566-1567
- Schafer EW Jr, Bowles WA, Hurlbut J (1983) The acute oral toxicity, repellency, and hazard potential of 998 chemicals to one or more species of wild and domestic birds. *Arch Environ Contam Toxicol* 12:355-382

- Silver A (1974) The biology of cholinesterases. In: Neuberger and Tatum EL (eds) *Frontiers of biology*. vol 36. American Elsevier Publishing Co, New York, p 1
- Smith GJ (1987) Toxicology and pesticide use in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds. *US Fish and Wildl Serv Res Pub* 170:1-171
- Stanley PI, Fletcher MR (1981) A review of wildlife incidents investigated from october 1978 to september 1979. *Pest Sci* 252:55-63
- Warkentin I, West NH (1990) Impact of long-term captivity on basal metabolism in birds. *Comp Biochem Physiol* 96A(3):379-381
- Westlake GE, Martin AD, Stanley PI, Walker CH (1983) Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain. *Comp Biochem Physiol* 76C:15-24
- Yawetz AM, Agosin M, Perry AS (1979) Metabolism of parathion and brain cholinesterase inhibition in four species of wild birds. *Pest Biochem Physiol* 11:294-300
- Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, NJ
- Zinkl JG, Roberts RB, Shea PJ, Lasmanis J (1981) Toxicity of acephate methamidophos to Dark-eyed juncos. *Arch Environ Contam Toxicol* 10:185-192

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. La DL_{50} utilisée ici est 31,6 mg/Kg PF pour l'Étourneau sansonnet (Schafer 1972)
2. Une dose de 31,6 mg/Kg PF représente 31,6 mg de matière active (diméthoate) par kilogramme de poids frais. Le fait que la solution commerciale contienne 23.9% de matière active a été pris en considération lors de la préparation des dosages.
3. Les données illustrées à la figure 5 ne présentent pas de relation statistiquement significative entre la dose (x) et la différence entre la température moyenne nocturne entre avant et après l'intoxication (y). Toutefois, on remarque que plus la dose est élevée, plus la différence de température moyenne nocturne (entre avant et après l'intoxication) est élevée. Ici, il est raisonnable de penser que cette tendance pourrait être confirmée statistiquement par une augmentation de l'échantillonnage.

CHAPITRE 6

IMPACT DE LA TEMPÉRATURE AMBIANTE SUR LE RÉTABLISSEMENT DE L'ACTIVITÉ DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE CÉRÉBRALE DU VACHER SUITE À UNE EXPOSITION À UN PESTICIDE ORGANOPHOSPHORÉ

L'inhibition de l'AChE dans le système nerveux central survient dans toutes les régions du cerveau y compris le complexe hypothalamique (Hahn *et al.* 1991) qui est l'une des régions cérébrales où l'on retrouve le plus de molécules d'OP après une exposition (Little *et al.* 1988). En plus de son rôle dans la régulation de la température corporelle, le complexe hypothalamique est également impliqué dans l'organisation temporelle de presque toutes les activités physiologiques journalières et circannuelles (Angeli *et al.* 1987, Gwinner 1986). Ainsi, l'ampleur du dérèglement de l'organisation circadienne de la température corporelle induite par une intoxication aux OPs (tel qu'étudié dans l'article précédent) devrait être fonction de l'ampleur de l'inhibition de l'AChE cérébrale. L'inhibition de l'AChE provoquée par un OP est généralement fonction de la dose (Hahn *et al.* 1991, Satyadevan *et al.* 1993, McDuff 1995). Plus la dose utilisée est forte, plus l'inhibition de l'AChE est prononcée et par conséquent, plus les paramètres chronobiologiques devraient être affectés. Cette relation a été observée dans le chapitre précédent.

On retrouve plusieurs évidences dans la littérature démontrant que, suite à une exposition aux OPs, l'hypothermie et/ou l'activité de l'AChE varient en fonction de la température environnementale (McDuff 1995, Maguire et Williams 1987a, Rattner *et al.* 1987, Maguire et Williams 1987b). Cependant, nous avons observé que la relation entre certains paramètres chronobiologiques du cycle de thermorégulation (excluant l'hypothermie) et la température ambiante était faible suite à l'intoxication au diméthoate. Le froid augmentant la toxicité des produits (Maguire et Williams 1987a, Rattner *et al.* 1987), nous aurions dû observer des relations entre la température ambiante et les paramètres du rythme de température corporelle. Une des explications nous ramène à la règle du Q_{10} de van't Hoff (1894) qui soutient que la vitesse de fonctionnement des tissus ou des cellules est

augmentée ou diminuée de 20-30% pour chaque 1°C d'augmentation ou de diminution de température. Alors, l'hypothermie provoquée par l'OP peut elle-même affecter le métabolisme, l'absorption ou l'excrétion de l'OP et ainsi affecter son propre déroulement. À cause de cette auto-influence, il devient alors difficile de prédire l'issue de l'hypothermie en terme de perturbation des rythmes circadiens. Il a été proposé que l'hypothermie, en provoquant un ralentissement du métabolisme des OPs, augmente la durée de présence active du produit et induit des inhibitions plus élevées de l'AChE cérébrale (Maguire et Williams 1987a, Meeter et Wolthius 1968). En examinant l'évolution de l'inhibition de l'AChE cérébrale en fonction du temps, nous allons pouvoir vérifier en partie cet aspect. La température environnementale ayant eu peu d'influence sur les perturbations des rythmes circadiens reliées à une exposition au diméthoate (chapitre 5), nous nous questionnons ici sur l'influence de la température ambiante sur l'inhibition de l'AChE cérébrale.

RÉSUMÉ

Les organophosphorés (OPs) représentent la classe de pesticides la plus utilisée sur les forêts, les fermes et les jardins domestiques. Cependant, plusieurs espèces non visées sont victimes d'intoxication aux OPs. Les OPs agissent en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui provoque une accumulation d'acétylcholine dans les systèmes nerveux périphérique et central. Il a été suggéré que les températures ambiantes froides accentuent l'impact des OPs sur l'AChE. Dans cette étude, nous avons suivi l'activité de l'AChE cérébrale du vacher (*Molothrus ater*) pendant 24 heures, à 25 °C, après l'ingestion d'une dose sous-létale de diméthoate en échantillonnant des oiseaux toutes les 2 hrs. L'AChE atteint son niveau le plus bas 4 à 6 hrs après l'exposition, soit en moyenne 30 % du niveau d'AChE normal. Lorsque cette expérience est répétée à 5 °C, le froid n'amplifie pas l'effet inhibiteur du diméthoate, mais rallonge la période nécessaire au rétablissement d'une activité cholinergique cérébrale normale. D'autre part, en suivant la température corporelle des oiseaux à l'aide d'un émetteur externe, nous avons démontré que le diméthoate provoque une période d'hypothermie environ 2 à 4 hrs après l'exposition, soit avant que l'AChE n'atteigne son niveau le plus bas.

Reproduction de l'article publié sous le titre de:

BRUNET, R. and J. MCDUFF. Recovery of Brain Cholinesterases of Brown-headed Cowbirds from Organophosphate Intoxication: Effect of Environmental Temperature. Bulletin of Environmental contamination and toxicology. sous presse.

Note: le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Julie McDuff a participé aux expériences.

INTRODUCTION

Organosphosphorus (OPs) represent the major class of broad-spectrum pesticides currently sprayed on forests, farmlands and gardens (Gallo and Lawryk 1991). Non-target species including mammals, fishes and birds are frequently injured by OPs (Smith 1987). Their acute effects are attributed to their inhibition of cholinesterases, leading to an accumulation of acetylcholine (ACh) in the central and peripheral nervous systems (Corbett 1974). Measurements of brain or plasma cholinesterase activity has been widely used to document the acute toxicity of OPs (review: Mineau 1991).

It is well known that the toxicity of anticholinesterases is influenced by ambient temperature (Baejter and Smith 1956; Fuhrman and Fuhrman, 1961; Ahdaya et al. 1976). Maguire and Williams (1987) reported that a cold stress enhances brain acetylcholinesterase (AChE) inhibition of chlorpyrifos-exposed Northern bobwhites. Parathion toxicity also increased when Japanese quails (*Contournix japonica*) were exposed to cold temperatures for a single day (Rattner 1982). Brain AChE activity of European starlings measured 24 hrs after being exposed to dimethoate was more inhibited at temperatures lower than at 25 °C (McDuff 1995). Hypothermia was also reported as a consequence of OPs intoxication (McDuff 1995), and was suggested to contribute to increased toxicity of OPs in cold temperatures (Rattner and Franson 1984). Cold temperature was suggested to reduce the birds metabolism, thereby retarding detoxification and increasing brain AChE inhibition (Maguire and Williams 1987). However, other studies reported that brain AChE activity of parathion-treated quails was no more inhibited (Rattner and Grue 1990) or even less inhibited (Rattner et al., 1987) at cold ambient temperature. In an attempt to shed more light on the impact of ambient temperature on OPs toxicity, we monitored during 24 hrs the impact of a single dose of dimethoate on the brain AChE activity and body temperature of brown-headed cowbirds at 5 °C and 25 °C.

MATERIALS AND METHODS

A total of 192 adult male brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) were captured with a cannon net and kept in an indoor aviary (3 m x 5 m x 5 m) for at least one month before the experiments to allow acclimatization (AOU Committee 1988), but no longer than three months to avoid changes in basal metabolism and body temperature (Warkentin and West, 1990). During this period, they were fed *ad libitum* with cracked corn and mixed seeds commercially prepared for wild birds. Vitamins and minerals were added to drinking water. Feeding sites were distributed at different places and heights in the aviary to minimize competition over resources. Relative humidity was $50 \pm 5\%$, temperature 15.0 ± 2.0 °C and illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux).

The impact of ambient temperature on dimethoate toxicity was assessed with four groups of 36 birds: a control group and a treated group exposed to 25 °C, a control group and a treated group exposed to 5 °C. All birds were equipped with an external thermosensitive transmitter fixed at the base of the neck on the jugular vein, after removing feathers and down (Brunet et al. 1996). They were then transferred to individual cages (0.15 x 0.3 x 0.6 m) within an experimental chamber 24 hrs before the experiment. Each cage was equipped with a perch, as well as food and water in sufficient amounts to last the whole experiment. Relative humidity was maintained at $50 \pm 5\%$, illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux) and ventilation at 1.5 l/min. The experiment started when the birds received either water or a sublethal dose of dimethoate injected directly into their crop by gavage with a cannulated syringe. The pesticide concentration was 15.80 mg/kg BW, which corresponds to 1/2 of the LD₅₀ estimated for European starlings (Schafer et al. 1983). Dilutions were prepared in water with dimethoate (Cygon 2E®) sold commercially as a 24.9 % active solution. Three birds were sacrificed every 2 hrs during 24 hrs to measure brain AChE activity, according to the technique of Hill and Fleming (1982) in $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ of brain. Nonparametric single factor analysis of variance (Kruskal Wallis) followed by Mann-Whitney tests were carried out to compare brain AChE activities and body temperatures through time and between ambient temperatures (Zar, 1984). Analyses were performed on the 144 birds that survived until they were sacrificed for brain AChE assays. Values of $p > 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Brain AChE activity of the control brown-headed cowbirds did not change significantly over 24 hrs at 5 °C ($H = 12.642$, $p = 0.32$) and 25 °C ($H = 13.06$, $p = 0.29$) (Fig. 1A). Similar results were reported for brain AChE activity of Northern bobwhites (Rattner and Fairbrother 1991). We also report that mean AChE activity was significantly lower at 25 °C than at 5 °C ($Z = -2.46$, $p = 0.014$) (Fig. 2A). Such effect of ambient temperature on brain AChE activity was also reported for European starlings (McDuff 1995). Figure 1A also indicates large variations in AChE activity among birds, as reported by Rattner and Fairbrother (1991) and by McDuff (1995). This probably constitutes the most important factor of difficulty in using AChE activity to monitor exposure to OPs. For this reason, an exposure to OPs was considered significant for AChE inhibition $\geq 20\%$ (Ludke et al. 1975).

Dimethoate exposure caused variations in brain AChE activity through times at 5 °C ($H = 27.00$, $p = 0.0046$) and 25 °C ($H = 19.86$, $p = 0.047$). At both temperatures, the birds experienced a gradual decrease in AChE activity during the first 6-7 hrs, which was followed by a recovery period that lasted at least 18 hrs (Fig. 1B). Mean brain AChE activity computed over the last 8 hrs of the experiment was significantly lower at 5 °C than at 25 °C (Mann-Whitney test, $Z = -2.46$, $p = 0.014$) (Fig. 2B). Similar results were obtained at 10% and 90% relative humidity (data not shown). The skin-feather air layer might have isolated the birds from the cooling effect of humidity. Maguire and Williams (1987) also reported that brain AChE activity of Northern bobwhites was more inhibited at cold temperatures. Brain AChE activity of European starlings measured 24 hrs after being exposed to dimethoate was more inhibited at low temperatures than at 25 °C (McDuff 1995). These results suggest that cold stress enhances brain AChE inhibition induced by OPs. However, continuous monitoring of AChE activity indicates that the initial decrease in AChE activity was not affected by ambient temperature, but that the birds exposed to 5 °C recovered more slowly than those at 25 °C (Fig. 1B). Therefore, ambient temperature affected the rate of recovery of brain AChE activity from dimethoate.

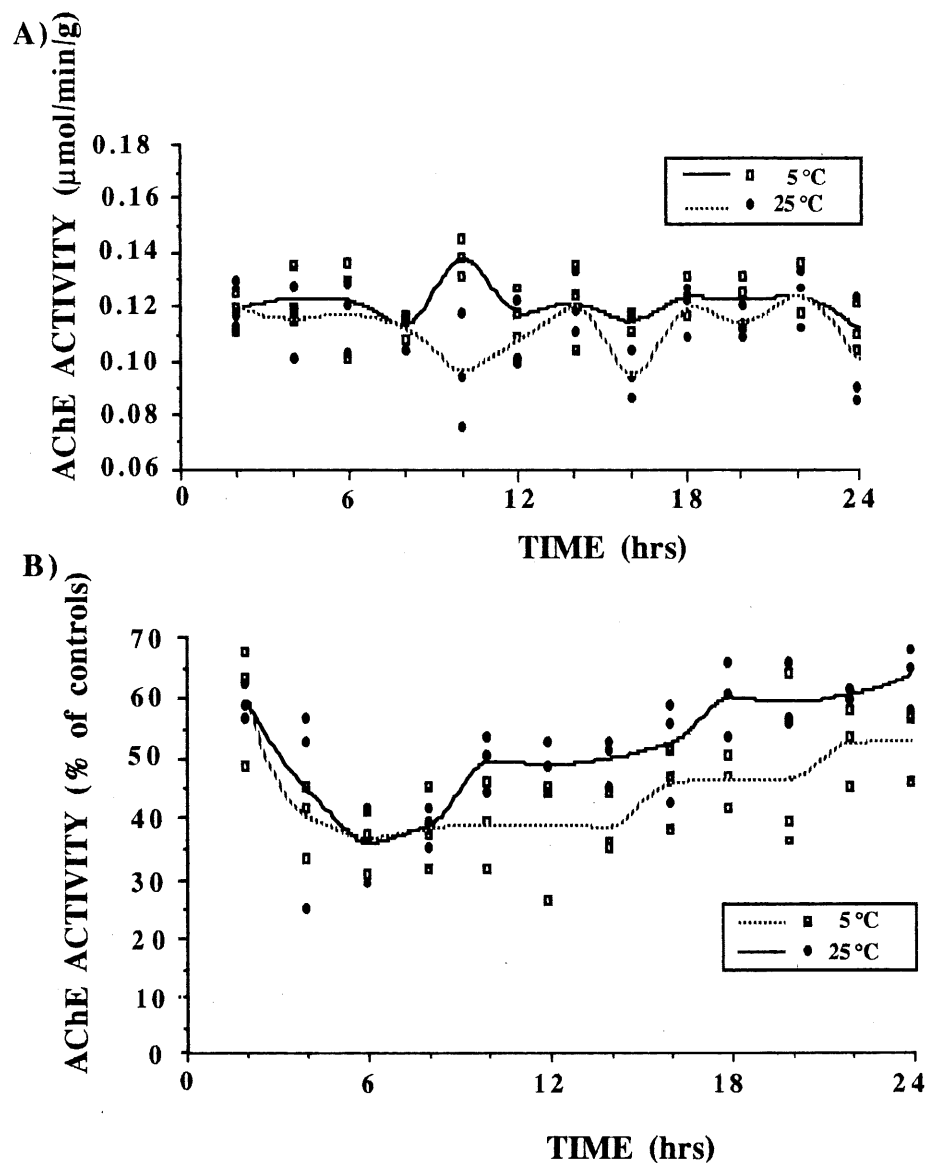


Figure 1. Impact of ambient temperature on daily variations in brain AChE activity of control brown-headed cowbirds (A) and birds exposed to dimethoate (B). Each symbol represents a single measurement. AChE activity of birds exposed to dimethoate was expressed in percent of the mean AChE activity of the control birds over 24 hrs at corresponding ambient temperatures.

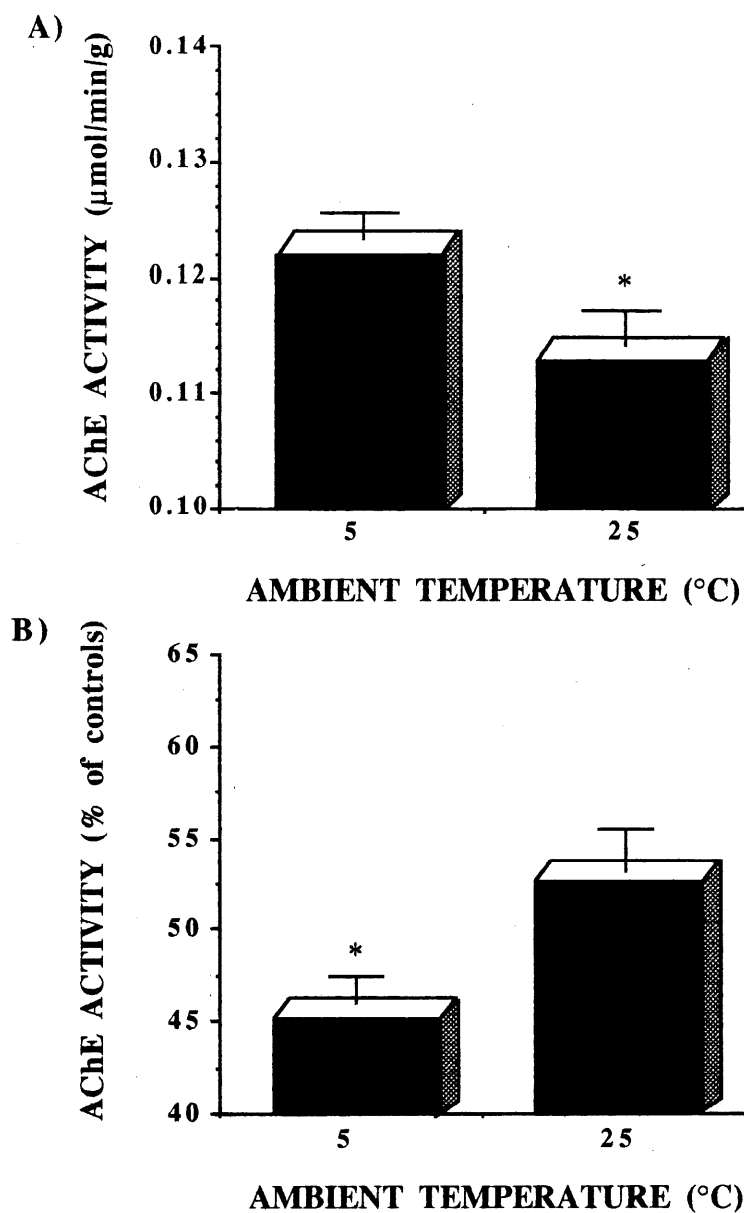


Figure 2. Impact of ambient temperature on mean AChE activity of control (A) and treated (B) brown-headed cowbirds. Values represent mean (\pm SEM) of 36 measurements. Mann-Whitney tests indicated significant difference (* $P < 0.05$).

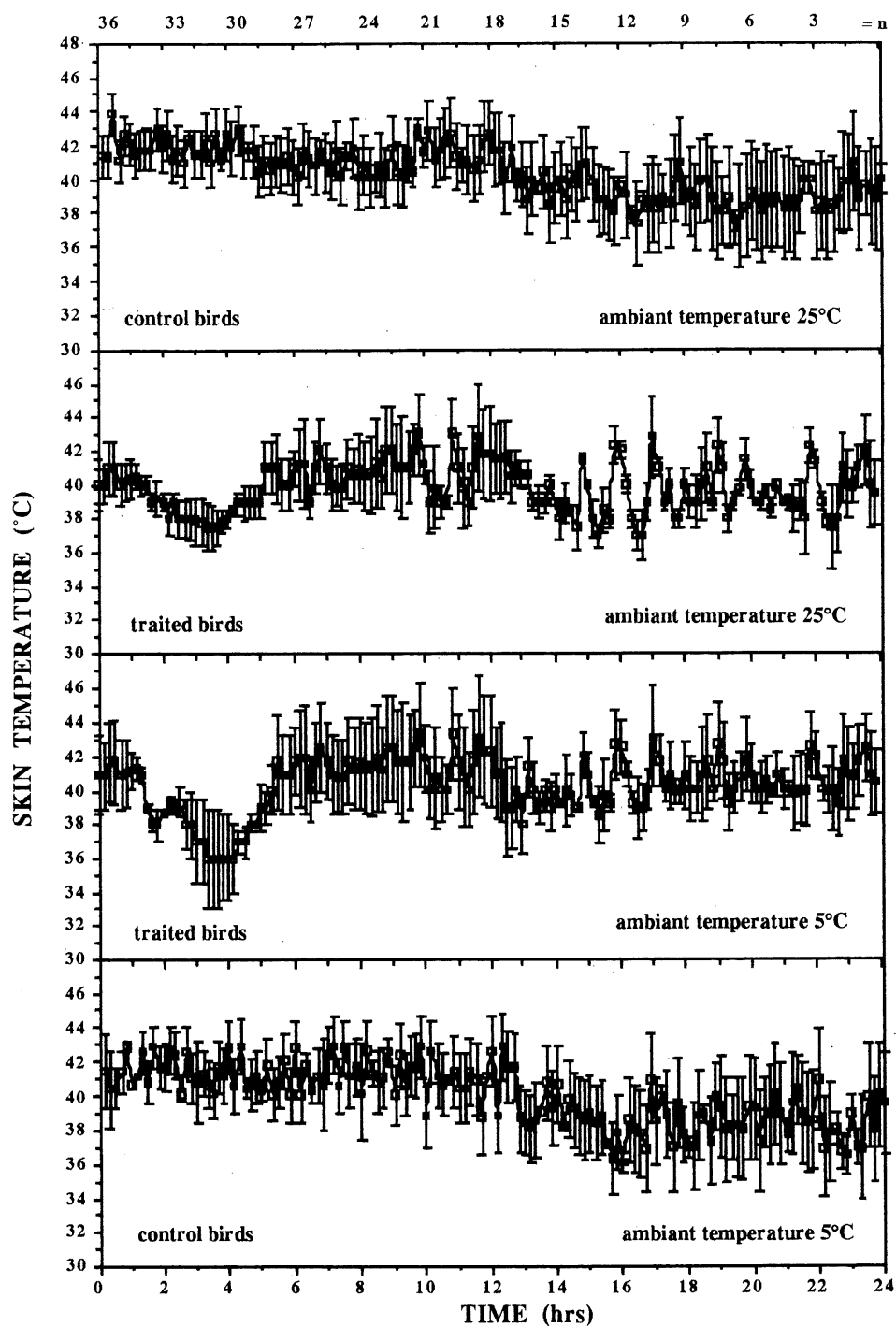


Figure 3. Daily cycle of body temperature of brown-headed cowbirds exposed to dimethoate at ambient temperatures of 25 °C and 5 °C. Values represent mean (\pm SD) temperature recorded every 10 min for all birds. Values of N above the figure indicates that the sample size decreased through time as three birds were sacrificed every 32 hrs.

The brown-headed cowbirds displayed a typical circadian cycle of body temperature, with a day-night range of 2.5 °C and a period of 24 ± 1 hrs at an ambient temperature of 25 °C (data not shown). Figure 3 illustrates the effect of pesticide exposure on the birds temperature cycle at 5 °C and 25 °C. At both temperatures, the birds experienced hypothermia 2 to 6 hrs after pesticide ingestion. Methyl parathion also induced hypothermia in American kestrels (*Falco sparverius*) (Rattner and Franson 1984). We also report that mean body temperature, computed between 2:00 and 6:00, was significantly lower under cold stress ($U = 16.13$, $p = 0.0012$). This relationship between OPs-induced hypothermia and ambient temperature was also reported for European starlings (McDuff 1995). Close comparison of the patterns of already restored normal body temperature when brain AChE activity was at its lowest level. Other studies have demonstrated that there does not appear to be a relationship between the degree of hypothermia and inhibition of brain AChE activity (Ahdaya et al. 1976; Rattner and Franson, 1984). The asynchrony between hypothermia and AChE inhibition could explain this lack of relationship. Dimethoate could be exerting hypothermic effects by acting at a specific region within the hypothalamus that would not be reflected as inhibition of whole brain AChE, or it could be acting peripherally.

In conclusion, we have demonstrated that, under these conditions, cold temperature does not increase brain AChE inhibition, but rather slows down the rate of recovery. We also provide evidence that cold temperature aggravates but does not prolong hypothermia. These results suggest that death occurring few hours after an exposure to an OPs, especially at cold ambient temperature. The death could be a consequence of unmanageable hypothermia. Whereas those encountered more than 8 hrs later could arise from a variety of symptoms associated with prolonged ACh accumulation in the nervous systems, including muscle incoordination and dehydration.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. We wish to thank Dr Brian Talbot for his technical support.

REFERENCES

- Ahdaya, SM, Shah PV, Guthrie FE (1976) Thermoregulation in mice treated with parathion, carbaryl, or DDT. *Toxicol Appl Pharmacol* 35:575-580
- AOU (American Ornithologist Union). 1988. Report of the *Ad Hoc* committee on the use of wild birds in research. *Auk Suppl* 105:1a-39a
- Baetjer AM, Smith R (1956) Effect of environmental temperature on reaction of mice to parathion, an anticholinesterase agent. *Am J Physiol* 186:39-46
- Brunet R, Dumais J, Thomas D (1996) Improved method for monitoring avian body temperature. *Physiol.Toxicol.* (submitted).
- Corbett JR (1974) The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, New York
- Fuhrman GJ and Fuhrman FA (1961) Effects of temperature on the actions of drugs. *Annu Rev Pharmacol* 1:193-199
- Gallo MA, Lawryk NJ (1991) Organic phosphorous pesticides. In: Hayes WJ Jr and Laws ER (eds) *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, Toronto, p 917
- Hill EF, Fleming WJ (1982) Anticholinesterase poisoning in birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ Toxicol Chem* 1:27-38
- Ludke JL, Hill EF, Dieter MP (1975) Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol* 3:1-21
- Maguire CC, Williams BA (1987) Cold stress and acute organophosphorus exposure: Interaction effects on juvenile Northern Bobwhite. *Arch Environ Contam Toxicol* 16:477-481
- McDuff J (1995) L'influence de la température environnementale sur la température corporelle et l'acétylcholinesterase cervicale de l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) exposé au diméthoate. Masters' thesis. Faculty of Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, pp 102
- Mineau P (1991) Difficulties in the regulatory assessment of cholinesterase-inhibiting insecticides. In: Mineau P (ed) *Cholinesterase-inhibiting insecticides*. Elsevier, New York, p 278
- Rattner BA (1982) Diagnosis of anticholinesterase poisoning in birds: effects of environmental temperature and underfeeding on cholinesterase activity. *Environ Toxicol Chem* 1:329-335

- Rattner BA, Beckler JM, Nakatsugawa T (1987) Enhancement of parathion toxicity to quail by heat and cold exposure. *Pestic Biochem Physiol* 27: 330-339
- Rattner BA, Fairbrother A (1991) Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity. In: P. Mineau (ed) *Cholinesterase-inhibiting pesticides: Impacts in wildlife and the environment*. Elsevier, New York. p.89
- Rattner BA, Franson JC (1984) Methyl parathion and fenvalerate toxicity in American kestrel *Falco sparverius* : acute physiological responses and effects of cold. *Can J Physiol Pharmacol* 62:787-792
- Rattner BA, Grue C.E. (1990) Toxicity of parathion to captive European starling (*Sturnus vulgaris*) - absence of seasonal effects. *Environ Toxicol Chem* 9:1029-1035
- Schafer EW Jr, Bowles WA, Hurlbut J (1983) The acute oral toxicity, repellency, and hazard potential of 998 chemicals to one or more species of wild and domestic birds. *Arch Environ Contam Toxicol* 12: 355-382
- Smith GJ (1987) Toxicology and pesticide use in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds. *US Fish and Wildl Serv Res Pub* 170:1-171
- Warkentin I, West, NH (1990) Impact of long-term captivity on basal metabolism in birds. *Comp Biochem Physiol* 96A(3):379-381
- Zar, JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, NJ USA. 718 p.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. Une dose de 31,6 mg/Kg PF représente 31,6 mg de matière active (diméthoate) par kilogramme de poids frais. Le fait que la solution commerciale contienne 23.9% de matière active a été pris en considération lors de la préparation des dosages.
2. L'injection du diméthoate par gavage a eu lieu au cours des 10 premières minutes suivant l'ouverture des lumières (donc au début de la phase de lumière). Le moment du gavage représente le temps 0 de l'expérimentation.

CHAPITRE 7

EFFETS DU DIMÉTHOATE SUR LES RYTHMES CIRCADIEUS DE TEMPÉRATURE CORPORELLE ET D'ACTIVITÉ DU PIGEON (*COLUMBA LIVIA*) EN FONCTION DU TEMPS

Au chapitre précédent nous avons constaté que la récupération de l'AChE cérébrale est modifiée en fonction de la température ambiante. Cette modification nous amène à considérer que l'impact de la température ambiante sur l'AChE cérébrale n'est pas une relation directe mais plutôt une influence indirecte qui fait en sorte que les symptômes de l'intoxication se font sentir plus ou moins longtemps et ce, dépendamment de la température environnementale. Jusqu'à présent, nous avons mesuré les effets à court terme du diméthoate sur les paramètres du rythme circadien de température. Cependant, les études que nous avons effectuées sur le taux d'activité des granivores (chapitre 2) suggèrent que les effets du pesticide se prolongent sur plus d'une semaine. Dans le but d'explorer cette possibilité, nous avons ici mesuré simultanément les effets à long terme du diméthoate sur les rythmes d'activité et de température corporelle chez le Pigeon biset. L'hypothèse de travail est qu'une seule exposition au diméthoate engendre des modifications à long terme dans les rythmes d'activité et de température corporelle qui sont encore observables après plusieurs jours. Ces mesures simultanées devraient nous permettre de comparer les résultats des deux techniques afin de faire ressortir les avantages et les points faibles de chacune. De plus, les résultats présentés ici nous amènent à constater l'utilité et l'efficacité des rythmes en tant qu'outils pour tracer les différences entre les animaux qui vont survivre et ceux qui vont mourir.

RÉSUMÉ

Le diméthoate est un insecticide de la classe des organophosphorés couramment utilisé en milieu agricole ou forestier ainsi que dans les potagers. Dans cette étude nous décrivons

l'effet à long terme du diméthoate sur les rythmes circadiens de température corporelle et d'activité chez le Pigeon Biset (*Columba livia*). Le diméthoate (15,8 mg/k) a induit une augmentation de la variabilité de la période tant pour le cycle de thermorégulation que le cycle d'activité. Les périodes sont passées de 24 ± 1 hr à 24 ± 2 hrs. De plus, le temps requis pour atteindre la température minimale nocturne a augmenté, passant de 2.8 ± 1.5 hrs à 6.5 ± 2.7 hrs. Le niveau d'activité diurne a été réduit de plus de 60% et le niveau d'activité nocturne est devenu irrégulier suite à l'exposition au produit. La température corporelle diurne n'a pas été affectée alors que la température corporelle nocturne est devenue irrégulière et a grimpé de 1.5°C . Les symptômes ont persisté pendant au moins 10 jours puis se sont dissipés au cours des 5 jours suivants. Vingt jours après l'intoxication, seuls la température corporelle nocturne ainsi que le niveau d'activité nocturne demeuraient encore beaucoup plus variables que chez les témoins. Les mortalités survenues ont été associées à l'incapacité de retrouver des paramètres circadiens normaux, notamment par la persistance de la variabilité de la période et du temps requis pour atteindre la température minimale nocturne. Ces résultats démontrent que le suivi à long terme des rythmes circadiens de la température corporelle et du niveau d'activité s'avère efficace pour recueillir des informations complémentaires sur l'impact des organophosphorés et que ces informations peuvent être utilisées pour évaluer les chances de survie des espèces non visées.

Reproduction de l'article soumis sous le titre de:

BRUNET, R. and J. MCDUFF. Time-course study of the impact of dimethoate on the circadian cycles of body temperature and activity of rock dove (*Columba livia*). Biological Rhythm Research (Novembre 1996).

Note: Le premier auteur certifie avoir fourni la contribution principale à l'élaboration et la réalisation de toutes les expériences, de même que les analyses et la rédaction de cet article. Julie McDuff a également participé aux expériences et aux analyses ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Dimethoate is an organophosphorus pesticide currently sprayed on farmlands, forests and gardens. In this study, we describe the long-term effects of dimethoate on the circadian cycles of body temperature and activity level of rock dove (*Columba livia*). The pesticide induced an increase in variability of the periods of both cycles from 24 ± 1 hrs to 24 ± 2 hrs, and in the time to reach minimum overnight body temperature from 2.8 ± 1.5 hrs to 6.5 ± 2.7 hrs. Diurnal activity level was reduced by more than 60%, and nocturnal activity level became irregular. Diurnal body temperature was not affected, while nocturnal body temperature was increased by 1.5°C and became highly variable. Most symptoms persisted at least 10 days, then the birds entered a recovery period of at least 5 days. Only nocturnal body temperature and activity level were still highly variable 20 days after pesticide exposure. Mortality was associated with a failure to recover normal rhythmic parameters, namely variability in the period and in the time to reach minimum overnight body temperature, mean diurnal activity level and mean nocturnal body temperature. These results show that long-term monitoring of circadian cycles of body temperature and activity level provides complementary informations on the impact of OPs on non-target species, and can be used to assess the birds' chances of survival.

INTRODUCTION

Organophosphorus pesticides (OPs) represent a good proportion of all pesticides sold commercially in industrial countries (Gallo and Lawryk, 1991). However, non-target species including mammals, fishes and birds are frequently injured by OPs (Smith, 1987; Stanley and Fletcher, 1981; Mineau and Peakall, 1987; Greig-Smith et al., 1990). These pesticides inhibit acetylcholinesterase (AChE) activities, which results in an accumulation of acetylcholine (ACh) in the central and peripheral nervous systems (O'Brien, 1967; Corbett, 1974). For this reason, measurements of brain or plasma AChE inhibition have been widely used to document the effects of sublethal doses of OPs on non-target species (review: Mineau, 1991). A 20% inhibition was judged sufficient to confirm an exposure to OPs (Zinkl et al., 1981).

Sublethal doses of OPs induce a profound depressive state that can have a direct bearing on the survival of an individual (Bignami et al., 1975). Granivorous birds reduced their activity level by at least 75% on the day they ingested dimethoate bran baits (5.5 mg/kg BW) (Brunet and Cyr, 1992). Dimethoate given orally to red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) also caused a 70% decrease in activity level (≥ 1.34 mg/kg BW) (Brunet et al., 1996a). The period of the circadian cycle of activity level was also reported to fluctuate further away from 24 hrs after birds were exposed to dimethoate (Brunet and Cyr, 1992). The impact of dimethoate on birds activities was shown to persist at least a week after behavioral symptoms had disappeared (Brunet et al., 1996a). These results suggest that circadian rhythms of activity level could constitute a very sensitive tool to study the long-term effects of OPs.

Acute exposure to OPs also affects the birds circadian rhythms of thermoregulation. Field monitoring of body temperature of American robin (*Turdus migratorius*) indicated a drop in body temperature 2 to 4 hrs after exposure to dimethoate (Brunet et al., 1994). Other OPs such as methyl parathion also induce hypothermia in birds (Rattner and Franson, 1984). We recently demonstrated that dimethoate affects other parameters of the temperature cycle, including the period and the range in day-night temperature (Brunet et al., 1996b). However, these studies were not designed to provide informations on the rate of recovery of normal thermoregulation.

In this work, we investigated the long-term effects of an acute dose of dimethoate on the circadian cycles of activity and body temperature of rock doves in captivity. Results indicate that these two circadian cycles are affected differently by the pesticides, and thus provide complementary informations on the birds recovery.

MATERIALS AND METHODS

Experimental birds

A total of 30 adult rock doves were captured with a canon net and kept in large aviaries for at least one month before the experiments to allow acclimatization (Ad Hoc AOU Committee, 1988), but no longer than three months to avoid changes in basal metabolism and body temperature (Warkentin and West, 1990). During this period, they were fed *ad libitum* with cracked corn and mixed seeds commercially prepared for wild birds. Vitamins and minerals were added to drinking water. Relative humidity was $50 \pm 5\%$, temperature 15.0 ± 2.0 °C and illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux).

Experimental procedures

Each bird was equipped with a radio telemetry thermosensitive transmitter (1.8 g, Holohill) fixed with surgical glue at the base of the neck (Brunet et al., 1996c) and then transferred to individual cages (1.0 x 1.0 x 1.0 m) within an experimental chamber. Each cage was equipped with a perch, as well as food and water in sufficient amount to last the whole experiment. The birds activities were recorded by infrared detectors positioned close to the perch, the feeding site, and at the bottom of the cage. All experiments were performed at 20 ± 0.5 °C, relative humidity at $50 \pm 5\%$, illumination on a 12:12 LD cycle (400:0 lux) and ventilation at 1.5 l/min.

Body temperature and activity level of 10 birds were monitored simultaneously during 30 days. At the onset of day 11, they received 15.80 mg dimethoate/kg BW. Cygon 2E was purchased as a solution containing 24.9 % dimethoate dissolved in Cyclo-Sol 63 (American Cyanamid Co.). Radvanyi *et al.* (1986) have demonstrated that the solvent in which dimethoate is manufactured does not in itself inhibit the activity of brain AChE. After Dilutions were prepared in 0.2 ml distilled water and given directly into the birds'

crop with a syringe connected to a canula. The birds' body weight was recorded on days 1, 10 and 30.

The impact of the dose of dimethoate on AChE activity was tested with two groups of 10 birds. One group received the pesticide on day 11 (treated group) and the other received distilled water (control group). Then all birds were sacrificed 24 hrs later to measure brain AChE activity. The brains were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until AChE activity was assayed according to the technique of Ellman et al. (1961) modified by Hill and Fleming (1982). Mean brain AChE activity recorded after pesticide exposure was expressed in percent of mean AChE activity of the control birds.

Data analysis

The effect of the different doses of dimethoate on circadian parameters of body temperature and activity level were compared by a Mann-Whitney U or a Wilcoxon. Regression analyses were performed for each parameter through time (Zar, 1984). The period was calculated by autocorrelation analyses at different lag times using a computer program.

RESULTS

Rock doves displayed several signs of intoxication after they ingested an oral dose of 15.80 mg dimethoate/kg BW. They experienced muscle incoordination, diarrhea and lethargy during several hours. Brain AChE activity measured 24 hrs after exposure was inhibited by $62.1 \pm 11.7\%$. Mean body weight of the 10 rock doves monitored for circadian parameters did not change significantly through time before exposure, with mean values of 355.6 ± 11.7 g and 352.7 ± 11.5 g measured on day 1 and 10, respectively (Figure 1). In contrast, the birds lost at least 15% of their body weight over 20 days after they received the pesticide ($Z=-6.15$ $p < 0.001$). We also report that three birds died, on days 25, 27 and 29, respectively. Figure 1 shows that these birds lost significantly more

weight 27% ($Z=-7.45$ $p < 0.001$) before they died than those that survived to the pesticide ($Z_{tr-m}=-2.45$ $p < 0.05$).

Figure 2 shows typical examples of circadian cycles of body temperature and activity level recorded two days before and after dimethoate exposure. The two cycles were affected by the pesticide. Dimethoate caused an increase in variability of the period of both cycles from 24 hrs, and in the time to reach minimum overnight body temperature after the lights were turned off. During the light phase, the birds activity level was drastically reduced, while body temperature was not notably modified. During the dark phase, activity level was not affected, while body temperature was increased and became highly variable. We examined the long-term impact of dimethoate on each of these parameters over 20 days after pesticide exposure.

Desynchronization of the birds from the 12:12 LD light cycle was analysed using two different parameters: the period of the circadian rhythms and the time to reach minimum overnight body temperature. First, dimethoate increased the variability around 24 hrs of the period of the body temperature cycle (Figure 3A). Before exposure, 80% of the periods were within the 23-25 hr range, for an average variability of 0.7 ± 0.5 hrs. During the first 10 days after they ingested the pesticide, 32% of the periods of the birds that survived were within that range, compared to 20% for the three birds that died before the end of the experiment. Survivors showed partial recovery during the last 10 days of experiment, with 53% of their periods within the 23-25 hr range. A linear decrease in period variability was observed during the last 20 days ($R^2 = 0.31$, $p < 0.05$). Such relationship was not detected for the periods of the birds that died. These birds maintained a mean period variability of 1.9 ± 0.9 hrs ($Z = -2.22$, $p < 0.05$).

The period of the cycle of activity level responded similarly to the pesticide (Figure 3B). During the first 10 days of experiment, 60% of the periods were in the 23-25 hr range, which corresponded to an average variability of 0.9 ± 0.6 hrs. During the first 10 days after exposure, this value had decreased to 36% for all 10 birds. The survivors showed signs of recovery during the last 10 days, with 67% of the periods in the 23-25 hr range. A linear reduction in period variability was detected over the last 20 days for the birds that

survived ($R^2 = 0.562$, $p < 0.001$), but not for the birds that died. These birds maintained a period variability significantly higher than expressed before pesticide exposure, with an average value of 1.6 ± 1.0 hr ($Z = -2.34$, $p < 0.025$).

Long-term monitoring of the time to reach minimum overnight body temperature indicated that the birds responded by an increased variability from one day to the next (Figure 4A). Mean variability increased from 2.8 ± 1.5 hrs before exposure to 6.5 ± 2.7 hrs during the first 10 days after treatment ($Z = -2.54$, $p < 0.025$). The survivors gradually recovered over 20 days ($R^2 = 0.27$, $p < 0.001$), but not the birds that eventually died. Mean variability calculated over the last 20 days for these three birds was 8.2 ± 3.2 hrs ($Z = -2.496$, $p < 0.025$).

The time to reach minimum overnight activity level reacted differently to the pesticide (Figure 4B). Mean variability through time was not significantly modified after exposure for the three birds that died before the end of the experiment, with 0.75 ± 0.88 hrs and 87.00 ± 0.75 hrs, respectively. In contrast, the survivors reacted to the pesticide by showing less variability than the other two groups, with a mean value of 0.47 ± 0.65 hrs ($Z_{tr-m} = 2.98$, $p < 0.005$; $Z_{tr-c} = 2.541$, $p < 0.025$). They showed no sign of recovery before the end of the experiment.

During the light phase, body temperature was not affected significantly by an exposure to dimethoate (Figure 5A). Average values were 40.9 ± 0.8 °C for the 10 birds before exposure, 41.5 ± 0.9 °C for the birds that died before the end of experiment, and 41.0 ± 0.8 °C for those that survived. In contrast, the birds activity level was markedly reduced within hours after they ingested the pesticide (Figure 5B). Mean diurnal activity level decreased from 8.23 ± 1.61 hrs to 4.87 ± 2.53 hrs during the first 10 days after exposure ($Z = -3.674$, $p < 0.001$). The activity level of the survivors gradually returned to normal ($R^2 = 0.81$, $p < 0.001$) during the last 10 days, while the birds that eventually died showed no sign of recovery.

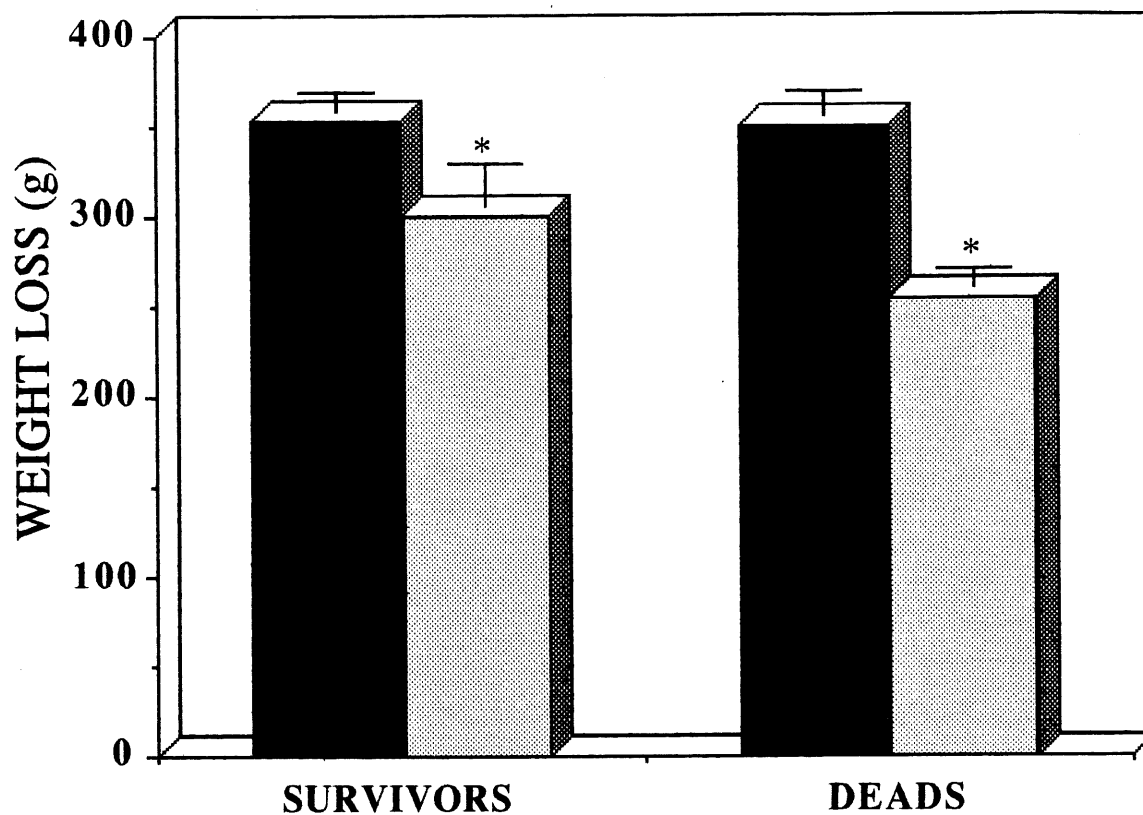


Figure 1. Impact of dimethoate on the body weight of rock doves in captivity. All ten birds had similar body weights on day 10 (■). Pesticide exposure on day 11 caused significant weight losses by the end of experiment (▨). The birds that survived to the pesticide (N = 7) lost less weight than those that died before day 30 (N = 3; Days 15, 17 and 19).

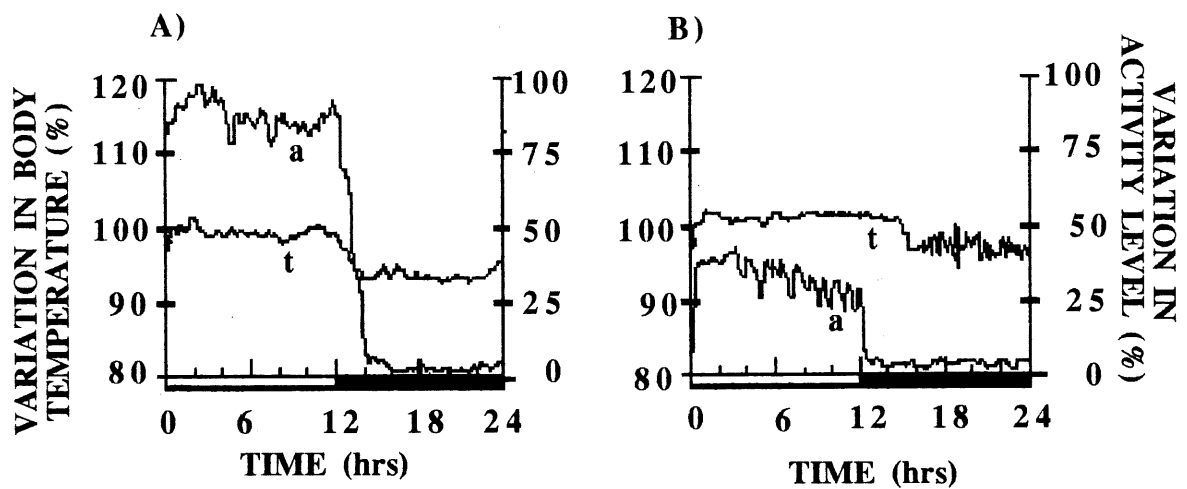
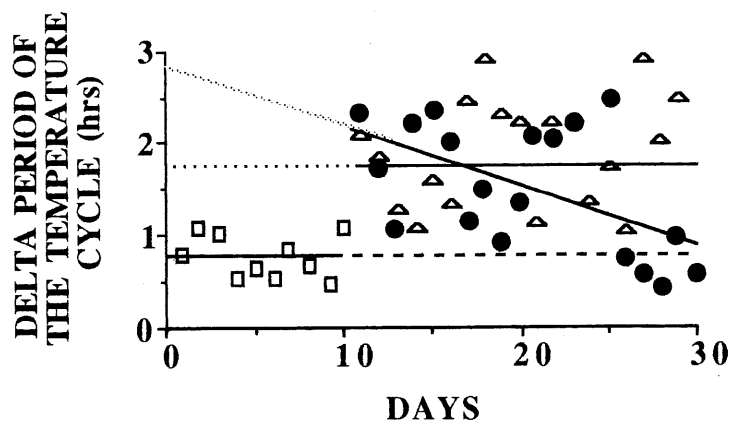


Figure 2. Typical daily cycles of body temperature (t) and activity level (a) of a rock dove recorded before (A: day 8) and after (B: day 13) ingestion of a single dose of dimethoate. Values were expressed as percentage of mean body temperature or mean activity level recorded during the light phase of the 24-hr period on day 8. The dark periods of the 12:12 LD cycle are indicated by the black bars on the abscissa.

A)



B)

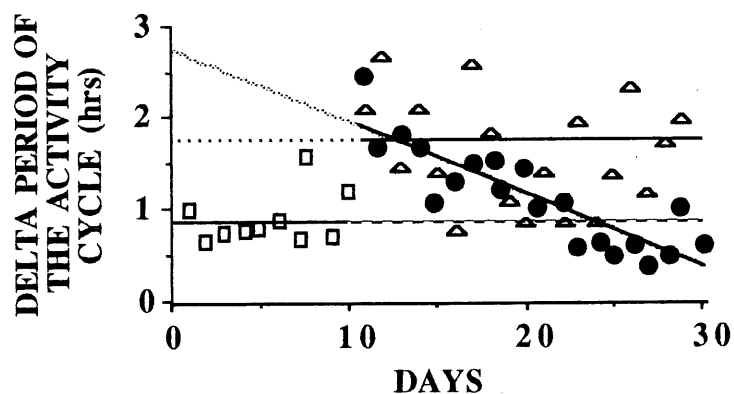


Figure 3. Long-term effect of dimethoate on the variability of the period of the circadian cycle of (A) body temperature and (B) activity level around 24 hrs. Values were expressed as the mean difference from 24 hrs for all 10 birds on days 1 to 10 (\square), for the seven birds that survived to the pesticide exposure on day 11 (\bullet), and for the three birds that died on days 25, 27 and 29 (\triangle). Equations: (A) $y = 2.80 - 6.34x$; $R^2 = 0.31$; $F = 8.47$, $P < 0.025$. (B) $y = 2.76 - 7.89x$. $R^2 = 0.5625$; $F = 21.594$, $P < 0.001$.

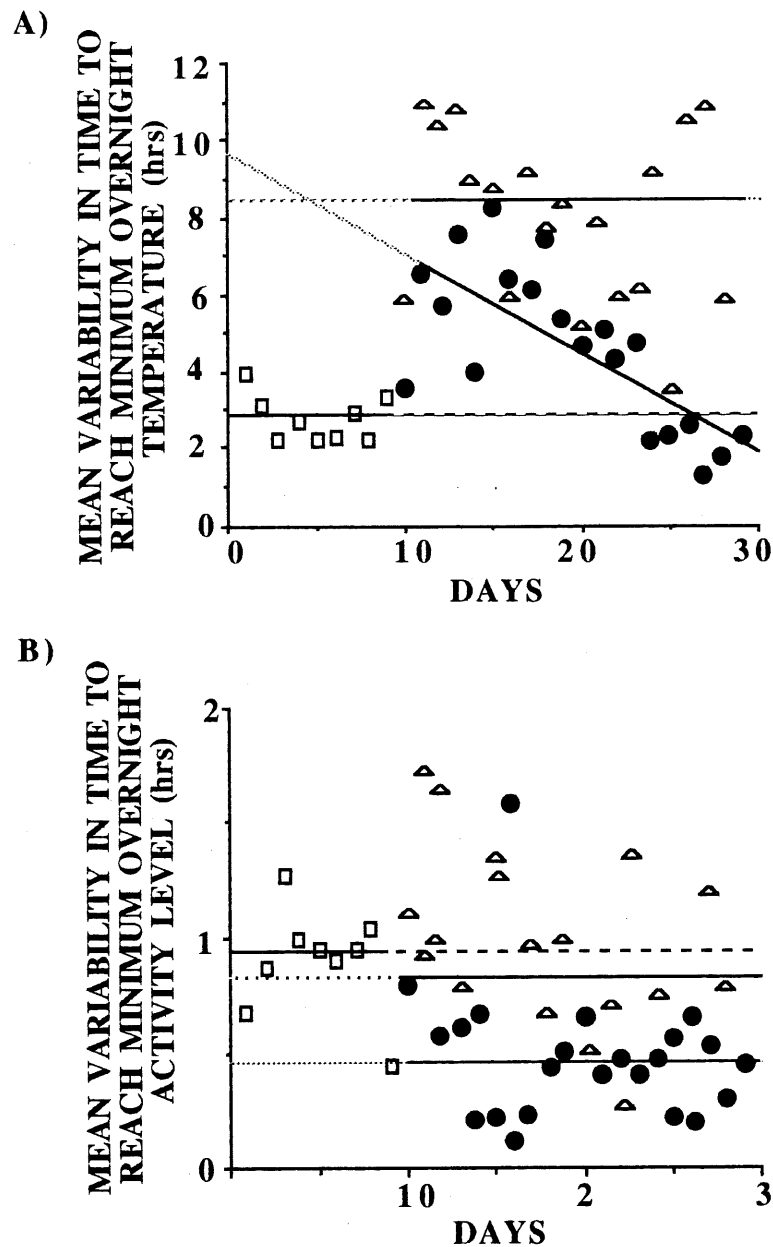


Figure 4. Long-term effect of dimethoate on the variability in time to reach minimum overnight (A) body temperature and (B) activity level. Values were expressed as mean difference in time to reach minimum overnight temperature from the preceding night in absolute values, for all 10 birds on days 1 to 10 (\square), for the seven birds that survived to the pesticide exposure on day 11 (\bullet), and for the three birds that died on days 25, 27 and 29 (Δ). Equations (A:) $y = 9.62 - 0.26x$. $R^2 = 0.27$; $F = 23.97$, $P < 0.001$.

During the dark phase, body temperature of all 10 birds increased from an average of 38.7 ± 0.7 °C to 40.0 ± 0.5 °C over the first 10 days after exposure (Figure 6A). All birds gradually decreased their body temperature during the last 10 days. The birds that survived tended to recover normal body temperature ($R^2=0.44$ $p < 0.001$), while the three other birds cooled down below 38 °C before they died ($R^2=0.59$, $p < 0.001$). Nocturnal activity level was not affected by the pesticide, and no significant relationship was established through time (Figure 6B). Average values were 50.9 ± 20.6 min for the control group, 49.0 ± 19.7 min for the birds that died during the experiments and 46.8 ± 17.6 min for the survivors.

Dimethoate exposure was also characterized by an instability in nocturnal body temperature (Figure 7A). Mean daily variation in body temperature among birds increased from 0.6 ± 0.3 °C before exposure to 2.3 ± 0.5 °C and 2.5 ± 0.5 °C for the birds that died and those that survived, respectively ($Z_{c-m} = -3.76$ $p < 0.005$, $Z_{c-tr} = -3.703$ $p < 0.001$). Nocturnal activity level was affected similarly by the pesticide (Figure 7B). Mean daily variation in activity level among birds increased from 28.4 ± 9.7 min before exposure to 40.0 ± 14.8 min and 42.9 ± 15.7 min for the birds that died and those that survived, respectively ($Z_{c-m} = -2.075$ $p < 0.05$, $Z_{c-tr} = -2.118$ $p < 0.05$). These two parameters showed no sign of recovery over 20 days.

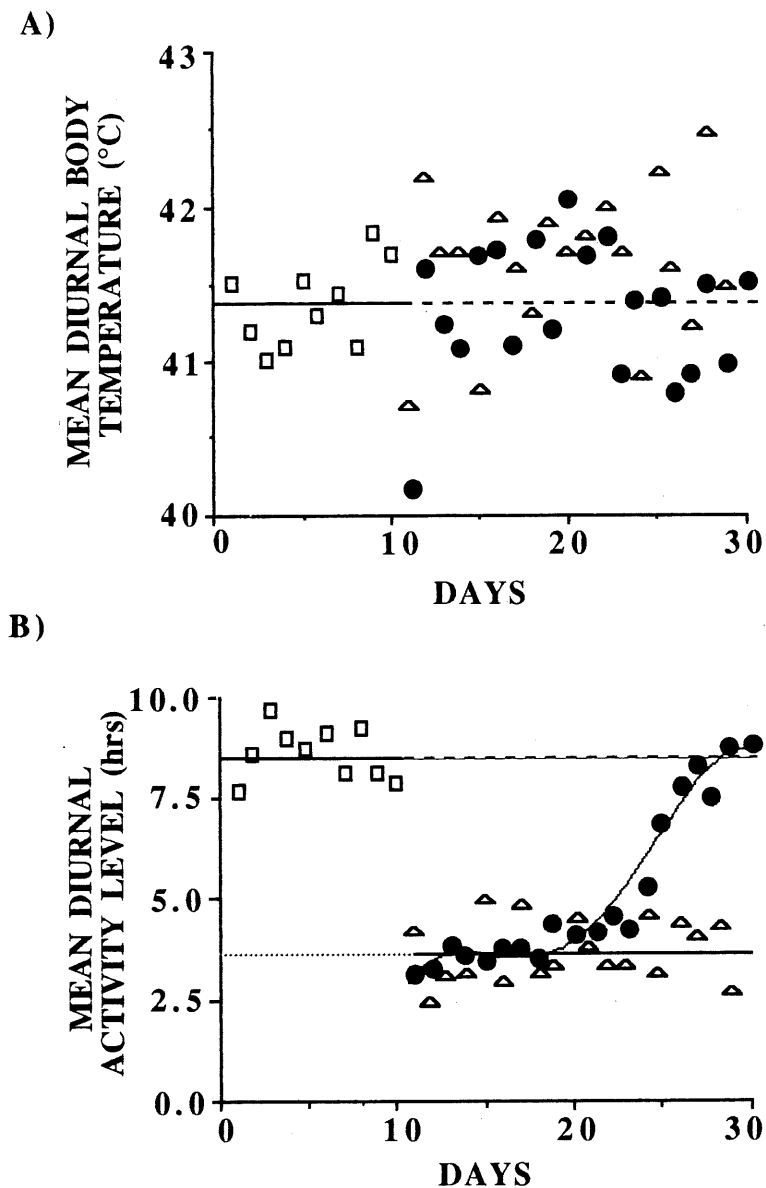


Figure 5. Long-term impact of dimethoate on mean diurnal (A) body temperature and (B) activity level. Symbols designate values for the 10 birds on days 1 to 10 (\square), for the seven birds that survived to pesticide exposure on day 11 (\bullet), and for the three birds that died on days 25, 27 and 29 (Δ). Equation: (B) $y = -0.00001757 + 42247x - 3428.2x^2 + 118.53x^3 - 1.45x^4$; $R^2 < 0.81$; $F = 11.649$, $P < 0.001$.

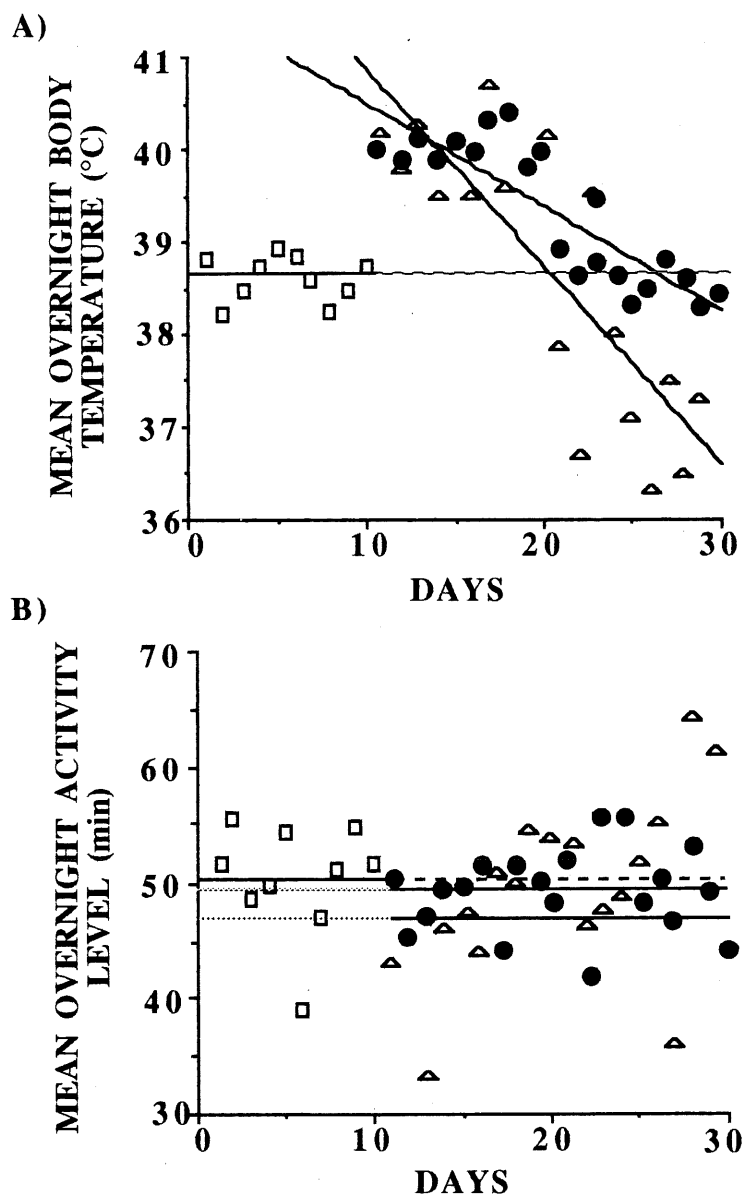


Figure. 6. Long-term impact of dimethoate on mean overnight (A) body temperature and (B) activity level. Symbols designate values for the 10 birds on days 1 to 10 (□), for the seven birds that survived to pesticide exposure on day 11 (●), and for the three birds that died on days 25, 27 and 29 (Δ). Equations: (A:) $y = 41.65 - 0.11x$; $R^2 = 0.44$; $F = 42.091$, $P < 0.005$. (A:) $y = 43.033 - 0.21401X$. $R^2 = 0.59$; $F = 77.646$, $P < 0.001$.

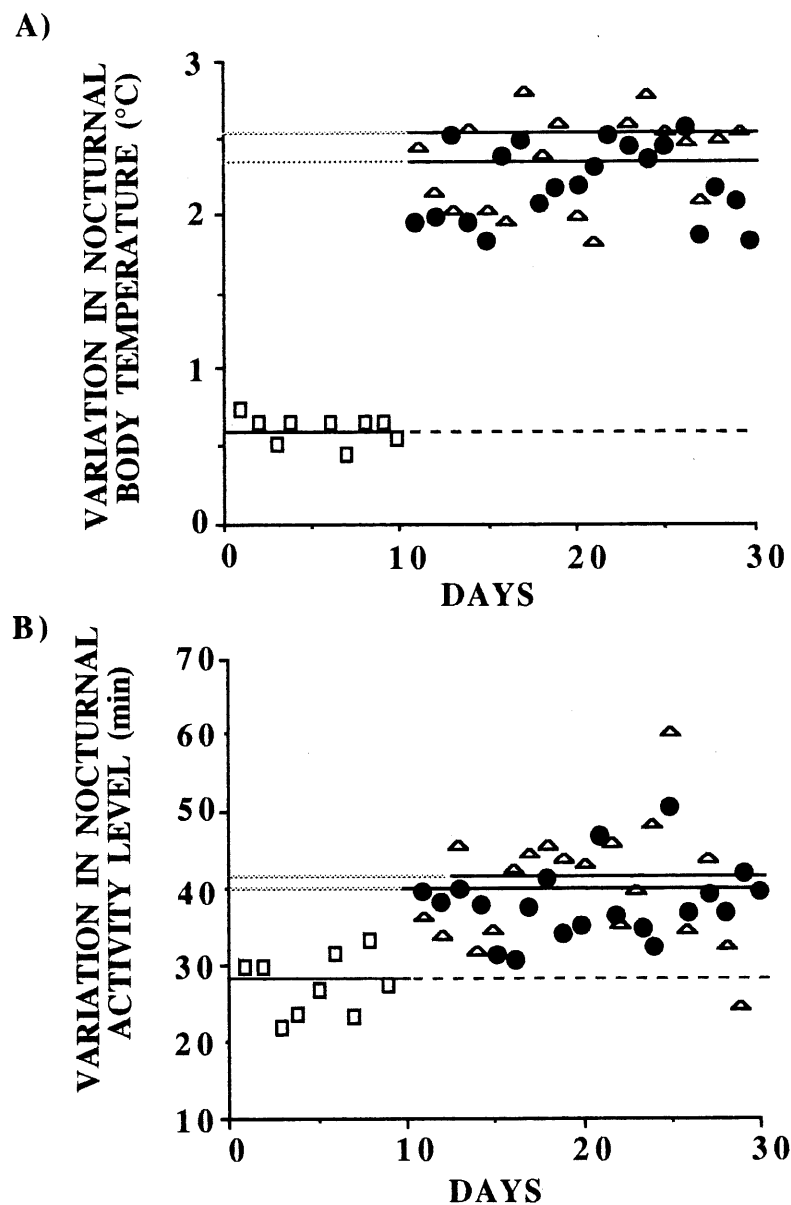


Figure 7. Long-term impact of dimethoate on the variation in (A) nocturnal body temperature and (B) activity level. Values represent the standard deviation from daily average body temperature for all 10 birds on days 1 to 10 (□), for the seven birds that survived to the pesticide exposure on day 11 (●), and for the three birds that died on days 25, 27 and 29 (Δ). Control birds (N=10), intoxicated birds that survived (N=7), or died (N=3).

DISCUSSION

We have demonstrated that dimethoate leads to several modifications in the circadian cycles of body temperature and activity level of rock doves. The dose of dimethoate used in this study, 15.8 mg/kg BW, yielded a 62% inhibition of brain AChE activity measured after 24 hrs, and a 15% decrease in body weight after 20 days. Severe weight loss in birds is not unusual following an exposure to ChE inhibitors (Grue, 1982; Grue and Shipley, 1984). European starlings experienced a 14% decrease in body weight and a 55-77% inhibition of brain AChE activity only 24 hrs after a single exposure to dicotophos (Grue and Shipley, 1984). Hart (1991) reported that brain AChE inhibitions above 27% were associated to a decrease in feeding activity, which could be partly responsible for their reduction in body weight.

Dimethoate desynchronized the circadian rhythms of the rock doves from the 24-hour cycle imposed in captivity. Before pesticide exposure, 80% of the periods of the temperature cycle, and 60% of the periods of the activity cycle, were between 23 and 25 hrs. During the first 10 days after pesticide exposure, less than a third of the periods of both cycles were within that range. The birds gradually recovered their synchrony with the zeitgeber over the next 10 days. These results confirm our recent findings that dimethoate desynchronized the period of the temperature cycle of European starlings from the 24-hour cycle on the day of exposure (Brunet et al., 1996b). Dimethoate provided as baits affected the period of activity of three granivorous birds species, song sparrows (*Melospiza melodia*), savannah sparrows (*Passerculus sandwichensis*) and american goldfinches (*Carduelis tristis*), kept in continuous dim light (Brunet and Cyr, 1992). Under these conditions, many birds became aperiodic, and the symptoms persisted 6 to 15 days. In the present study, the fact that none of the rock doves lost periodicity might be explained by the influence of the 24-hour light cycle on their rhythms.

The circadian cycles of activity and temperature responded differently to dimethoate during the light and the dark phase. During the light phase, the birds body temperature was not affected by the pesticide. In contrast, diurnal activity level was reduced by about 60%. Acute doses of OPs have been shown to suppress the activities of other birds and

mammals (Shaker et al., 1988; Bignami et al., 1975; Grue and Shipley, 1981). For instance, granivorous birds experienced a 60-75% reduction in activity level during 15 days after they ingested about 5.5 mg/kg BW of dimethoate (Brunet and Cyr, 1992). During the dark phase, the bird's average nocturnal activity level was not affected by the pesticide. Yet, variability in the time to reach minimum overnight body temperature increased from 2.8 to 6.5 hrs, minimum overnight body temperature was raised by 1.5 °C, and they experienced increased variability in activity level and body temperature. Karczmar (1984) reported that AChE inhibitors modify the EEG and REM patterns of sleep. Moreover, OPs intoxication in birds has been associated to diarrhea (Kozar et al., 1976; Grue, 1982), which could also wake them up frequently, and thus induce short-term increases in body temperature and activity level. All these modifications of the nocturnal body temperature by dimethoate were already in play during the first night that followed exposure, as reported previously (Brunet et al., 1996b). Most parameters were affected during about 10 days, and slowly recovered normal values within the following 10 days.

Mortality could be related to a lack of recovery of normal rhythmic parameters. Three birds died before the end of the experiment, on days 25, 27 and 29, respectively. Although their level of brain AChE inhibition was similar to those of the birds that survived, they experienced more severe weight loss. We decided to analyse their rhythmic parameters separately from the survivors in an attempt to shed more light on the causes of mortality associated to an anticholinesterase pesticide. Although they reacted like the other birds during the first 10 days after exposure, they showed no sign of recovery of normal period of body temperature and activity level before they died. During the light phase, their activity level remained about 60% lower than before exposure. During the dark phase, they experienced a similar increase in body temperature, but their body temperature decreased rapidly below 38 °C during the recovery period. They also maintained a high variability in the time to reach minimum overnight body temperature of more than 8 hrs over the 20 days that followed dimethoate exposure. In a recent study, we compared the impact of dimethoate on the circadian cycle of body temperature and on brain AChE inhibition of European starlings (*Sturnus vulgaris*) measured during 24 hrs after exposure (Brunet et al., 1996b). While mortality occurred over a wide range of AChE inhibition, the birds chances of survival were drastically reduced when mean overnight body

temperature was increased by more than 4%. For a mean value of 38 °C, a 4% increase in body temperature represents a rise of 1.5 °C, which is considerable for avian body temperature (review: Prinzinger et al., 1991). If the birds are not immediately killed by the pesticide, their survival would be expected to depend largely on their energy reserves. An impaired ability to find food during the day, combined to the metabolic cost of maintaining warmer body temperatures during the night, might become critical, if not fatal, should the physiological effects remain for several days. Under such conditions, birds would also be more vulnerable to predators.

We have shown that the circadian cycles of activity and temperature of rock doves were affected during at least two weeks. Although enzyme assays indicate that the birds excrete OPs within hours (O'Brien and Yamamoto, 1970), the slow recovery in circadian rhythms does not necessarily parallel the gradual disappearance of dimethoate in the bloodstream. In fact, the activity level of rodents (Bignami et al., 1975) and birds (Bakre and Rajasekaran, 1989) was shown to be proportional to brain AChE activity. And brain cholinesterase (ChE) activities of mallard ducks, bobwhite quails, barn owls, starlings and common grackles were shown to require in average 26 days to recover after being depressed by 55-64% with oral doses of dicotophos (Flemming and Grue, 1981). Therefore, circadian rhythms could be used as an indirect measurement of the impact of OPs on brain AChE activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We wish to thank Dr B. Talbot for his technical support.

REFERENCES

- AOU (AMERICAN ORNITHOLOGIST UNION) (1988): Report of the *Ad Hoc* committee on the use of wild birds in research. Auk Suppl. 105: 1a-39a.

- BAKRE, P. and RAJASEKARAN, M. (1989): Acute toxicity of certain pesticides to House Sparrow (*Passer domesticus*). *Geobioscience* 16: 249-251.
- BIGNAMI, G., ROSIC, N., MICHALEK, H., MILOSEVIC, M., and GATTI, G.L. (1975): Behavioral Toxicity of Anticholinesterase Agents. In: B. Weiss and U.G. Laties (Editors), *Methodological, Neurochemical, and Neuropsychological Aspects*. Plenum Press, New York, pp. 155-215.
- BRUNET, R. and CYR, A. (1992): The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. *Agric. Ecosyst. Environ.* 41: 327-336.
- BRUNET, R., MINEAU, P., DAOUST, G. and GAUTHIER, G. (1994): Évaluation sur le terrain du suivi de la température corporelle pour détecter une intoxication du Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) au chlorpyrifos. *Service canadien de la faune. Hull. KA 168-2-1033*. 81p.
- BRUNET, R., GIRARD, C. and CYR, A. (1996a): Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of Red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. *Agric. Ecosyst. Environ.* (in press).
- BRUNET, R., MCDUFF, J. and CYR, A. (1996b): Impact of dimethoate on the circadian cycles of body temperature of European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (in press).
- BRUNET, R., DUMAIS, J. and THOMAS, D.W. (1996c) Improved method for monitoring avian body temperature. *Physiol. Zool.* (submitted).
- CORBETT, J.R. (1974) *The biochemical mode of action of pesticides*. Academic Press, New York.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.J.R. and FEATHERSTONE, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- FLEMMING, W.J., and GRUE, C.E. (1981): Recovery of AChE activity in 5 avian species exposed to dicotophos, an OP pesticide. *Pest. Biochem. Physiol.* 16: 129-135.

- GALLO, M.A. and LAWRYK, N.J. (1991): Organic phosphorous pesticides. In: Hayes WJ Jr and Laws ER (eds) Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, Toronto, p 917.
- GREIG-SMITH, P.W., FLETCHER, M.R., HUNTER, K., QUICK, M.P., RUTHVEN, A.D. and SHAW, I.C. (1990): Pesticide poisoning of animals 1988: Investigations of suspected incidents in Great Britain. Report of the Environmental panel of the advisory committee on pesticides. MAFF, London.
- GRUE, C.E. (1982): Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11: 617-626.
- GRUE, C.E. and SHIPLEY, B.K. (1981): Interpreting population estimates of birds following pesticide applications - behavior of male starlings exposed to an organophosphate pesticide. Studies Avian Biol. 6: 292-296.
- GRUE, C.E. and SHIPLEY, B.K. (1984): Sensitivity of nestling and adult starlings to dicotophos, an organophosphate pesticide. Environ. Res. 35: 454-465.
- HART, A.D.M. (1991): Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. In: Mineau P. (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides. Elsevier, New York, p. 151-209
- HILL, E.F. and FLEMING WJ (1982): Anticholinesterase poisoning in birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. Environ. Toxicol. Chem. 1: 27-38.
- KARCZMAR, A.G. (1984): Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. Fund. Appl. Toxicol. 4: S1-S17.
- KOZAR, M.D., OVERSTREET, D.H., CHIPPENDALE, T.C. and RUSSELL, R.W. (1976): Changes of acetylcholinesterase activity in three major brain areas and related changes in behaviour following acute treatment with diisopropyl fluorophosphate. Neurophysiol 15: 292-298.
- MINEAU, P. (1991): Difficulties in the regulatory assessment of cholinesterase-inhibiting insecticides. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides. Elsevier, New York, p 278.

- MINEAU, P. and PEAKALL, D.B. (1987): An evaluation of avian impact assessment techniques following broad-scale forest insecticide sprays. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 781-791.
- O'BRIEN, R.D. (1967): *Insecticides: Action on metabolism*. Academic Press, New York.
- O'BRIEN, R.D. and YAMAMOTO, I. (1970): *Biological toxicology of insecticides*. Academic Press, New York.
- PRINZINGER, A., PREBMAR, A. and SCHLEUCHER, E. (1991): Mini Review. Body temperature in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A: 499-506.
- RADVANYI, A., KROEGER, P., BUSBY, D.G. and SHAW, G.G. (1986): Response of quail, pheasants and sparrows to one oral of dimethoate and to consumption of dimethoate treated bran baits. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 616-621.
- RATTNER, B.A. and FRANSON, J.C. (1984): Methyl parathion and fenvalerate toxicity in American kestrel *Falco sparverius* : acute physiological responses and effects of cold. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 787-792.
- SMITH, G.J. (1987): Toxicology and pesticide use in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds. *US Fish and Wildl. Serv. Res. Pub.* 170: 1-171.
- STANLEY, P.I. and FLETCHER, M.R. (1981): A review of wildlife incidents investigated from october 1978 to september 1979. *Pest. Sci.* 252: 55-63.
- WARKENTIN, I. and WEST, N.H. (1990): Impact of long-term captivity on basal metabolism in birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 96A(3): 379-381.
- ZAR, J.H. (1984): *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, NJ.
- ZINKL, J.G., ROBERTS, R.B., SHEA, P.J. and LASMANIS, J. (1981): Toxicity of acephate methamidophos to Dark-eyed juncos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 185-192.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

1. Au total, 30 oiseaux ont été utilisés: 10 pour établir le niveau d'activité de base de l'AChE cérébrale (témoins), 10 pour mesurer l'inhibition de l'AChE cérébrale et 10 pour le suivi des cycles de température corporelle et d'activité.
2. L'ensemble des régressions du chapitre 7 ont été réalisées à partir des données brutes, toutefois, pour augmenter la clarté des figures, seules les moyennes ont été illustrées. Les équations des droites de régression et les coefficients de détermination (R^2) correspondent aux régression effectuées sur l'ensemble des données.
3. Lorsque que l'on calcule le pourcentage d'inhibition c'est toujours par rapport au groupe de témoins; la valeur moyenne de l'activité de l'AChE des témoins (en $\mu\text{moles/min/g}$ de poids frais de cerveau) devient la valeur de référence (100% d'activité de l'AChE) à partir de laquelle on calcule un niveau d'activité (en %) pour chaque individu traité (règle de 3). Ce niveau d'activité est soustrait de 100%, ce qui nous donne le pourcentage d'inhibition de l'AChE par rapport aux témoins. On peut alors calculer, pour un groupe d'individus ayant reçu un même traitement, une moyenne d'inhibition de l'AChE et son écart-type.
4. Les droites de régression illustrées aux figures 3 à 7 sont utilisées ici pour démontrer et représenter le type de relation qui existe entre x et y. Dans les cas où la régression est significative, l'équation de la droite est définie au bas de la figure. Dans le cas où la régression n'est pas significative, une droite de pente nulle est dessinée pour représenter la moyenne du groupe. Une population de données dont la régression est significative (i.e. dont il existe une relation significative entre x et y) est nécessairement différente d'une population où il n'existe pas de relation significative entre x et y (i.e. régression non-significative). Les moyennes de ces dernières populations de données ont été comparées entre elles par un test de Mann-Withney U ou de Wilcoxon.

5. Dans cette publication, l'emploi du terme désynchronisation sous-entend une fluctuation autour d'une valeur considérée comme la norme plutôt qu'un manque d'entraînement. Le terme déphasage serait plus approprié.

CONCLUSION

L'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence le potentiel des rythmes circadiens comme nouvel outil de suivi et de détection des impacts provoqués par les OPs. L'ensemble des travaux présentés ici illustre clairement le potentiel des rythmes circadiens pour la détection d'une exposition aux agents anticholinergiques, et pour le suivi à long terme des effets des pesticides organophosphorés sur l'état de santé général des espèces non visées en captivité ou possiblement en milieu naturel.

Au premier chapitre, nous avons mis en évidence pour la première fois l'impact d'un agent anticholinergique sur les rythmes circadiens d'activité des oiseaux. De plus, cette étude démontre qu'un mélange d'agents anesthésiants, l'alpha-chloralose et le sécobarbitol, perturbent les rythmes pendant plus d'une semaine après que les oiseaux aient repris connaissance. Par conséquent, nous proposons qu'il faudrait allouer aux oiseaux une période minimale de deux semaines pour éliminer les effets de l'anesthésiant utilisé pour leur capture, avant de tester les effets d'un autre produit en laboratoire. Ces résultats renforcent donc l'importance de suivre les directives du comité Ad Hoc de l'AOU (1988), concernant la gestion des animaux capturés pour des expériences en laboratoire. Ces directives recommandent de placer en quarantaine pendant un minimum d'un mois les oiseaux sauvages avant de les utiliser pour les expérimentations. Ceci réduit les risques de prise de données erronées durant les expériences.

Jusqu'à présent, les effets des OPs, autres agents anticholinergiques, avaient été rapportés sur les rythmes de développement des gonades (Earnest et Turek 1983) et sur le déphasage des rythmes de mémorisation par rapport à l'horloge interne (Meck 1983). Raslear et Kaufman (1983) avaient rapporté des effets des OPs sur les rythmes d'activité des rats. Ainsi se limitaient les études des OPs sur les rythmes. De plus, elles avaient toutes été effectuées sur des mammifères. Au second chapitre, nous avons démontré à notre tour que les pesticides OPs, modifient les rythmes circadiens d'activité chez des oiseaux. Ceci constitue un avancement intéressant étant donné que les oiseaux font partie des espèces les plus touchées parmi les espèces non visées par les OPs (Brealey *et al.* 1980, Westlake *et al.* 1983). L'absence ou le faible niveau en A-estérases dans le plasma

sanguin des oiseaux (Mackness *et al.* 1988, Brealey *et al.* 1980) semble être le facteur majeur qui explique cette grande sensibilité aux OPs (Brealey *et al.* 1980, Machin *et al.* 1975, Westlake *et al.* 1983, Walker et Mackness 1987). L'ingestion d'une dose de diméthoate réduit le taux d'activité des oiseaux et perturbe la distribution journalière de l'activité. Nous confirmons aussi que les OPs affectent l'état général des oiseaux pendant plus d'une semaine, comme dans le cas des anesthésiants anticholinergiques. Par conséquent, les rythmes circadiens d'activité peuvent constituer un outil extrêmement sensible pour la détection et le suivi des effets des pesticides organophosphorés.

Au chapitre 3, nous avons approfondi nos connaissances sur les comportements reliés à une intoxication sublétales à un OP. En utilisant une gamme très large de doses, nous avons établi l'ordre d'apparition des différents symptômes dans le temps suivant l'exposition. Cette étude nous a aussi permis de constater que les symptômes disparaissent dans les premières 24 heures après l'exposition, ce qui pose un problème majeur pour les études sur le terrain. En effet, les comportements reliés à une exposition aux OPs étant de courte durée, ils sont donc difficiles à observer en milieu naturel. Ce chapitre décrit aussi les effets du diméthoate sur le taux d'activité du Carouge à épaulettes. Au chapitre précédent, nous avons démontré qu'une dose sublétales de diméthoate cause une diminution du taux d'activité chez plusieurs espèces d'oiseaux granivores. Nous avons approfondi ce point en testant différentes doses de diméthoate. Nous avons constaté que le diméthoate induit une augmentation du taux d'activité à de faibles doses, et une diminution du taux d'activité à des doses plus élevées. Par conséquent, nous proposons que l'impact des OPs sur l'activité des oiseaux soit discuté en terme de modifications et non pas en terme de réduction. Finalement, l'originalité de ce travail repose sur le fait que, pour la première fois, le comportement et le taux d'activité sont étudiés simultanément, et à différentes doses de diméthoate, ce qui apporte de nouvelles connaissances sur les effets à long terme des expositions sublétales.

Nous avons clairement démontré la sensibilité des rythmes circadiens pour les pesticides organophosphorés. Cependant, il serait difficile, voire impossible, d'utiliser les rythmes d'activité pour détecter et évaluer la durée des effets des OPs sur le terrain. Nous avons alors considéré l'utilisation des rythmes circadiens de température. Avant d'étudier

l'impact du diméthoate sur ces rythmes, nous devons améliorer les conditions de prises de données. L'émetteur thermosensible externe fixé sur l'oiseau enregistre sa température dermique (T_s), et non sa température corporelle interne (T_b). Ainsi, il est susceptible de répondre aux changements de température ambiante, et à un changement d'activité de l'oiseau, tel que l'envol. Au chapitre 4, nous avons déterminé les conditions expérimentales qui permettent d'utiliser un émetteur externe pour suivre les variations cycliques de la température corporelle des oiseaux. Nous avons exploré la position sur l'oiseau qui offre les mesures les moins influencées par l'environnement et l'activité des individus, et nous avons défini une relation mathématique qui permet d'extrapoler T_b à partir de T_s , et qui tient compte de la température ambiante et du poids corporel des oiseaux. Nous proposons donc une méthode plus rigoureuse du suivi de la température des oiseaux sur le terrain.

Cette nouvelle technique du suivi de la température des oiseaux nous a permis de confirmer que le rythme circadien de température est aussi affecté par les OPs. Jusqu'à ce jour, nos connaissances sur l'impact des OPs sur la température corporelle des espèces non-visées se limitaient à une période d'hypothermie de quelques heures, se produisant entre 2 et 8 heures après l'exposition (Rattner et Franson 1984, Brunet *et al.* 1994, McDuff 1995). Au chapitre 5, nous avons démontré que plusieurs paramètres du cycle de température sont affectés par le diméthoate durant les premières 24 heures. Nous avons aussi isolé deux paramètres qui pourraient permettre non seulement de détecter, mais aussi d'évaluer la gravité de l'intoxication au pesticide.

Au chapitre 5, il nous a été difficile d'établir une relation entre le pourcentage d'inhibition de l'AChE cérébrale et les risques de mortalité des oiseaux par suite d'une exposition au diméthoate. Étant donné que l'AChE était mesurée à la fin de l'expérience, il est possible que ce protocole ne nous ait pas permis de détecter des variations se produisant durant les 24 premières heures. D'autre part, plusieurs études rapportent une augmentation de la toxicité des OPs à des températures ambiantes plus chaudes (30-35 °C) ou plus froides (5-10 °C) (Ahdaya *et al.* 1976, Fleming *et al.* 1985, Rattner *et al.* 1982, Rattner et Franson 1984). Cependant, au chapitre 5, nous n'avons noté aucun effet de la température ambiante (-5 à 30 °C) sur les paramètres circadiens étudiés.

Au chapitre 6 nous avons suivi l'évolution de l'activité de l'AChE et de la température corporelle du vacher (*Molothrus ater*) pendant 24 heures après une exposition au diméthoate, et ce à deux températures ambiantes différentes, 5 et 25 °C. Ce protocole original nous a permis de démontrer qu'une température froide n'accroît pas l'inhibition de l'AChE suite à une exposition au diméthoate, mais plutôt qu'elle ralentit le taux de récupération du niveau d'activité de l'AChE cérébrale. Sur le terrain, ces résultats suggèrent qu'un oiseau exposé à un pesticide OP pendant une période de température froide sera affecté plus longtemps par le produit de sorte que ses chances de survie sont d'autant plus diminuées.

Toutefois, un suivi de la température corporelle sur 24 heures ne permet pas de déterminer la durée complète des effets des OPs. Le dernier chapitre va plus loin en ce sens. Il repose sur le suivi simultané de la température corporelle et du taux d'activité des pigeons pendant 20 jours après une exposition au diméthoate. Cette expérience nous a permis de constater que les rythmes d'activité et de température sont rapidement modifiés le jour même de l'exposition, et que ces effets persistent pendant plusieurs jours avant de montrer des signes de récupération. Le suivi des deux types de rythme nous permet d'obtenir une vision plus globale de l'état des oiseaux. Le jour, la température corporelle des oiseaux n'est pas très affectée, par contre, ils sont 60% moins actifs qu'à la normale. Étant donné que l'alimentation est l'activité diurne prédominante pour les oiseaux, une diminution du taux d'activité pourrait avoir des conséquences graves sur leur budget énergétique. La nuit, les oiseaux maintiennent une température plus chaude, ce qui requiert aussi une dépense énergétique supplémentaire. Vient s'ajouter une désynchronisation du cycle de température par rapport au cycle de lumière d'une période de 24 heures qui peut également entraîner un déficit énergétique. Tous ces facteurs contribuent probablement à la perte de poids de 15% mesurée à la fin de l'expérience qui pourrait être biologiquement significative dans des conditions climatiques sévères.

Le fait que les durées des effets sur les deux types de rythme soient semblables illustre bien que les rythmes circadiens renseignent l'expérimentateur sur l'état général de l'oiseau. D'autre part, nous avons aussi démontré que les rythmes endogènes sont

capitaux pour la survie des individus, étant donné que les oiseaux qui n'ont pas survécu à cette expérience étaient ceux qui ne montraient aucun signe de récupération des rythmes. Ces travaux reflètent bien l'importance des rythmes circadiens dans l'homéostasie des fonctions biologiques d'un individu.

D'un point de vue critique, l'ensemble de ces travaux ne représente qu'une première étape vers l'élaboration de nouvelles normes d'utilisation des OPs. Plusieurs questions demeurent en suspens. Premièrement, la perte de poids encourue par les oiseaux est-elle biologiquement importante ? Si oui, cela signifierait que plus l'oiseau est maigre, plus il risque de ne pas survivre à une exposition aux OPs. D'autre part, l'ensemble des expériences démontre que plus de 80% des mortalités surviennent dans les 3 dernières heures de la nuit. Étant donné que l'animal doit encourir une dépense énergétique supplémentaire associée au maintien d'une température corporelle plus chaude pendant la nuit, il est possible que ces oiseaux n'aient pas survécu parce qu'ils avaient épuisé leurs réserves d'énergie disponibles. Par conséquent, il faudrait envisager de tester l'impact des OPs sur les réserves énergétiques des oiseaux.

La diarrhée, le vomissement et l'anorexie entraînent tous un déséquilibre des électrolytes sanguins. Étant donné que ces effets font partie des symptômes d'une exposition aux OPs, il est envisageable que l'impact des OPs sur les rythmes proviennent aussi d'un déséquilibre des électrolytes sanguins.

Durant la nuit, les fluctuations dans la température corporelle et le taux d'activité des oiseaux persistent même 20 jours après l'exposition au diméthoate, alors que tous les autres paramètres rythmiques affectés par le produit sont retournés à des valeurs normales. Il serait intéressant de répéter des expériences à plus long terme afin de mieux comprendre ce phénomène et d'en évaluer les impacts et la signification biologique.

La signification biologique des résultats obtenus dans cette thèse est difficile, pour l'instant, à évaluer en totalité, cependant il est raisonnable de croire que tout changement dans la distribution de l'activité ou toute modification dans le patron de température

corporelle (tels que nous les avons observés) peuvent engendrer des coûts énergétiques supplémentaires pouvant mettre en péril la survie ou la reproduction des animaux. Ces coûts peuvent être plus ou moins importants selon l'espèce et selon le moment de la journée ou de l'année où l'exposition aux anticholinergiques a lieu. De façon générale, plus l'espèce est de petite taille, moins elle dispose de réserves en énergie et plus elle est susceptible de souffrir de façon significative d'une dépense énergétique accrue. De plus, comparativement aux espèces de plus grande taille, le ratio surface/volume plus élevé chez les petites espèces entraîne un refroidissement plus rapide et ainsi une plus grande demande en énergie nécessaire pour lutter contre le froid et maintenir sa température corporelle à un niveau acceptable. Au cours de la nuit, les oiseaux ont recours à l'hypothermie afin d'économiser leurs réserves énergétiques généralement limitées. Ainsi, toute perturbation de la thermorégulation nocturne va engendrer une augmentation des coûts et augmenter les risques de décès par épuisement des réserves. Par ailleurs, une modification dans le cycle d'activité peut empêcher l'animal d'accumuler suffisamment de réserves pour passer la nuit et ainsi compromettre ses chances de survie.

D'autre part, l'exposition d'un oiseau à un pesticide qui engendre des modifications dans sa thermorégulation au cours de la période de couvaison des oeufs peut contribuer à augmenter le coût de reproduction et ainsi affecter son succès reproducteur. Également, une perturbation du niveau d'activité durant la phase de nourrissage des jeunes peut entraîner un ralentissement de la croissance des jeunes ou les mener directement à la mort.

Le temps requis pour atteindre la température minimale nocturne se rapporte à la capacité de l'animal à prévoir les dépenses énergétiques à venir et à gérer l'utilisation de ses réserves en fonction des phases critiques anticipées. L'observation d'une instabilité au niveau de ce paramètre, suite à une exposition aux OPs, suggère une augmentation des cas de mauvaise gestion énergétique pouvant devenir fatale dans certains cas. La signification biologique de l'observation d'une instabilité au niveau de certains paramètres chronobiologiques étudiés ici, fait donc référence à l'équilibre énergétique et à la survie.

Dans la mesure où l'on tente de confirmer une exposition d'un animal à un OP, l'étude des modifications chronobiologiques s'avère fort utile et efficace en conditions contrôlées. Des

études énergétiques détaillées seraient nécessaires afin d'évaluer l'impact et la signification énergétique réelle des modifications chronobiologiques provoquées par un pesticide telles qu'observées dans cette thèse. De plus, des études doivent se poursuivre en milieu naturel dans le domaine chronobiologique afin de déterminer la fiabilité des paramètres circadiens à titre d'indicateurs d'exposition aux OPs. La grande sensibilité de ces paramètres aux OPs a été clairement démontrée au niveau des chapitres 3 et 5. Par contre, des études en milieu naturel et en laboratoire doivent se poursuivre afin de vérifier si ces perturbations circadiennes sont exclusives à l'intoxication aux OPs et dans la négative, afin d'isoler les autres facteurs provoquant une réponse identique. Ainsi, les études réalisées et présentées dans cette thèse, représentent les tous premiers pas vers une nouvelle avenue de recherche dont le sujet étudié représente un potentiel immense et prometteur pour l'évaluation des effets des OPs sur les espèces non-visées. Les bases pour l'utilisation de la chronobiologie dans ce domaine ont été établies ici, cependant elles doivent encore réussir avec succès plusieurs autres étapes d'évaluation et de raffinement.

Ces travaux ont toutefois permis de démontrer que les perturbations des paramètres rythmiques d'activité et de température sont proportionnels au niveau d'inhibition de l'activité de l'AChE cérébrale. Par conséquent, si une inhibition de 20% de l'activité de l'AChE est jugée suffisante pour détecter une exposition aux OPs (Ludke *et al.* 1975), les rythmes circadiens seraient suffisamment sensibles pour suivre l'évolution des effets du pesticide dans le temps, après l'exposition. Des études d'impact des OPs sur le terrain, impliquant le suivi de la température corporelle des oiseaux, devraient nous permettre d'obtenir des informations indispensables sur l'impact des facteurs environnementaux sur la toxicité des OPs, et ainsi fournir des éléments nécessaires à une meilleure gestion de ces produits. Les rythmes me semblent avoir un avenir prometteur pour fournir des informations essentielles dans la prise de décision concernant les normes d'utilisation d'agents anticholinergiques dans l'environnement. L'étude des rythmes et de leurs perturbations nous fournit un outil complémentaire à l'inhibition de l'AChE cérébrale et s'avère très intéressant pour les suivis à long terme, surtout si l'on considère les effets sur les espèces non visées dans le cadre du développement durable en environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- AHDAYA, S. M., P. V. SHAH et F. E. GUTHRIE. 1976. Thermoregulation in mice treated with parathion, carbaryl, or DDT. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35: 575-580.
- AL-JAGHBIR, M. T., A. S. SALHAB et F. A. HAMARSHED. 1992. Dermal and inhalation exposure to dimethoate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 358-361.
- ALDRIDGE, W. N. 1953. Serum esterases I. *Biochem. J.* 53: 110-117.
- ALDRIDGE, W. N. et E. REINER. 1972. Enzyme inhibitors as substrate. *Frontiers of biology*, vol 26. North-Holland. Amsterdam. 328 p.
- ANGELI, A. F., F. CARANDENTE, F. DAMMACCO, F. HALBERG et L. MARTINI. 1987. Asactide: acth-agonist for use in microdoses in brain-adrenal and other feedsidewards. *Chronobiol.* 14: 99-143.
- AOU (AMERICAN ORNITHOLOGISTS' UNION). 1988. Report of the Ad Hoc committee on the use of wild birds in research. *Auk Suppl.* 105: 1a-39a.
- ASCHOFF, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- ASCHOFF, J. 1963. Comparative physiology: diurnal rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 25: 581-600.
- ASCHOFF, J. 1966. Circadian activity pattern with two peaks. *Ecology* 47: 657-662.
- ASCHOFF, J. 1979. Circadian rhythms: influence of internal and external factors on period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.* 49: 225-249.
- AUGUSTINSSON, K.-B. 1948. Cholinesterases. A study in comparative enzymology. *Acta Physiol. Scand.* 15 (suppl. 52): 1-182.
- BAETJER, A. M. et R. SMITH. 1956. Effect of environmental temperature on reaction of mice to parathion, an anticholinesterase agent. *Am. J. Physiol.* 186: 39-46.

BARDIN, P. G., S. F. VAN EEDEN, J. A. MOOLMAN, A. P. FODEN et J. R. JOUBERT. 1994. Organophosphate and carbamate poisoning. Arch. Intern. Med. 154: 1433-1441.

BARNARDS, E. A. et A. W. ROGERS. 1967. Determination of the number, distribution and some *in situ* properties of cholinesterase molecules in the motor end plate, using labeled inhibitor methods. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144: 584-610.

BENINGER, R. J., B. A. WIESCHING, K. JHAMANDAS et R. J. BERGMAN. 1989. Animal studies of brain acetylcholine and memory. Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl. 1: 71-90.

BIGNAMI, G., N. ROSIC, H. MICHALEK, M. MILOSEVIC et G. L. GATTI. 1975. Behavioral Toxicology. Dans: Behavioral Toxicity of Anticholinesterase Agents: Methodological, Neurochemical and Neuropsychological Aspects. B. Weiss et U. G. Laties, Édts. Plenum Press, New York, Pp. 155-215.

BOWERS, E. Jr., E. GOODMAN et V. M. SIM. 1964. Some behavioral changes in man anticholinesterase administration. J. Nerv. Ment. Dis. 138: 383-389.

BREALEY, C. J., C. H. WALKER et B. C. BALDWIN. 1980. "A" esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. Pestic. Sci. 11: 546-554.

BRIMIJOIN, S. 1983. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. Prog. Neurobiol. 21: 291-322.

BRUNET, R. et A. CYR. 1990a. Étude de l'effet du chlorpyrifos sur les niveaux d'acétylcholinestérase et la mortalité chez le Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) en captivité. Dans: Effets physiologiques et comportementaux du traitement des pelouses au chlorpyrifos sur le Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*). R. Décarie et J.L. Desgranges, Édts. Rapport tech., Service Canadien de la Faune. Québec 105: 55-82.

BRUNET, R. et A. CYR. 1990b. Effet du stress de la manipulation sur le comportement du Carouge à épaulettes. J. Can. Zool. 68: 1168-1173.

- BRUNET, R. et A. CYR. 1992. The impact of dimethoate on rhythms of three granivorous bird species. *Agric. Ecosyst. Environ.* 41: 327-336.
- BRUNET, R., C. GIRARD et A. CYR. 1997. Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. *Agric. Ecosyst. Environ.* (sous presse).
- BRUNET, R., N. CAZA. et A. CYR. 1996. Food intake and circadian rhythms of activity of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). A time-course study on the effects of alpha-chloralose and secobarbital. *Biol. Rhythm Res.* 27: 227-240.
- BRUNET, R., P. MINEAU et M. GAUTHIER. 1992. Validation de la température corporelle comme indice d'intoxication du Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*). Service canadien de la faune, Hull, KE 144-1-2014, 76p.
- BRUNET, R., P. MINEAU, G. DAOUST et M. GAUTHIER. 1994. Évaluation sur le terrain du suivi de la température corporelle pour détecter une intoxication du Merle d'Amérique (*Turdus migratorius*) au chlorpyrifos. Service canadien de la faune, Hull, KA 168-2-1033, 81 p.
- BRUNET, R., S. GAUTHIER et A. CYR 1989. Does visual structural environment influence the periodicity of circadian activity rhythms in Red-winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 20: 249-256.
- BURGEN, A. S. V. et F. HOBIGER. 1951. The inhibition of cholinesterases by alkylphosphates and alkylphenophosphates. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 6: 593-605.
- BUTLER, T. C. 1949. Reduction and oxidation of chloral hydrate by isolated tissues *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 95: 360-362.
- CAIRNS, M. A., C. C. MAGUIRE et B. A. WILLIAMS. 1991. Brain cholinesterase activity of Bobwhite acutely exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 657-664.
- CLEMENT, J. G. 1993. Pharmacological nature of soman-induced hypothermia in mice. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 44: 689-702.

CLOUGH, G. 1982. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol. Rev.* 57: 487-523.

COHEN, J. A., et R. A. OOSTERBAAN. 1963. The active site of acetylcholinesterase and related esterases and its reactivity toward substrates and inhibitors. Pp. 299-373. Dans: *Cholinesterases and anticholinesterases agents*. G. B. Koelle, Éd. Springer-Verlag, Berlin, 512 p.

CORBETT, J. R. 1974. The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, New York, 330 p.

CORNWELL, P. B. 1969. Alphakil - a new rodenticide for mouse control. *Pharm. J.* 202: 74-75.

COSTA, L. G. et S. D. MURPHY. 1982. Passive avoidance retention in mice tolerant to the organophosphorus insecticide disulfoton. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 451-458.

CYR, A. et R. BRUNET. 1992. Anesthetization of captive Red-winged blackbirds with mixtures of alpha-chloralose and secobarbital. *J. Wildl. Manage.* 56: 806-809.

DEROSA, C. T., D. H. TAYLOR, M. P. FARRELL et S. K. SEILKOP. 1976. Effects of Sevin on the reproductive biology of the Coturnix. *Poultry Sci.* 55: 2133-2141.

DUFFY, F. H. et J. L. BURCHFIEL. 1980. Long-term effects of the organophosphate Sarin on EEG in monkeys and humans. *Neurotoxicology* 1: 667-689.

DUFFY, F. H., J. L. BURCHFIEL, P. H. BARTELS, M. GAON et V. M. SIM. 1979. Long-term effects of an organophosphate upon the human electroencephalogram. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 47: 161-176.

DURBA, J. L., R. A. POWELL et G. T. BARTHALMUS. 1989. Physiological and behavioral effects of Guthion on Pine Voles, *Microtus pinetorum*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 40: 80-86.

EARNEST, D. J. et F. W. TUREK. 1983. Role of acetylcholine in mediating effects of light on reproduction. *Science* 219: 77-79.

- ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES Jr. et R. M. FEATHERSTONE. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- ENVIRONMENT COUNCIL OF ALBERTA (ECA). 1981. Agriculture and the environment. Edmonton, 88 p.
- ETO, M. 1974. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. CRC Press, Cleveland, Ohio, 387 p.
- FAIRBROTHER, A. et J. K. BENNETT. 1988. The usefulness of cholinesterase measurements. *J. Wildl. Dis.* 24: 587-590.
- FAIRBROTHER, A., B. T. MARDEN, J. K. BENNETT et M. J. HOOPERDS. 1991. Methods used in determination of cholinesterase activity. Pp 35-71. Dans: Cholinesterase-inhibiting insecticides. P. Mineau, Éd. Elsevier, New York, 348 p.
- FARRIS, E. J. et J. Q. GRIFFITH Jr. 1949. The rat in laboratory investigation. 2^{ième} édition. Pp 303-314. Lippincott, Philadelphia, 542 p.
- FIBIGER, H. C., G. S. LYNCH et H. P. COOPER. 1971. A biphasic action of central cholinergic stimulation on behavioral arousal in the rat. *Psychopharmacologia (Berl.)* 20: 366-382.
- FLEMING, W. J. 1981. Recovery of brain and plasma cholinesterase activities in ducklings exposed to organophosphorus pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 215-229.
- FLEMING, W.J., G. H. HEINZ, J. C. FRANSON et B. A. RATTNER. 1985. Toxicity of abate 4^e temephos in mallard ducklings and the influence of cold. *Environ. Toxicol. Chem.* 4: 193-199.
- FRYDAY, S. L., A. D. M. HART et N. J. DENNIS. 1994. Effects of exposure to an organophosphate on the seed-handling efficiency of house sparrow. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 869-876.

GALLO, M. A. et N. J. LAWRYK. 1991. Organic phosphorus pesticides. Pp 917-1123. Dans: Handbook of Pesticide Toxicology, vol. 2. W. J. Hayes Jr et E. R. Laws Jr, Éds. Academic Press, Toronto, 1123 p.

GEETHA, L., M. K. CHANDRASHEKARAN et R. SUBBARAJ. 1996. Responses of the circadian locomotor activity rhythm of *Mus booduga* to shifts in LD schedules. Chronobiol. Int. 13: 103-112.

GELLER, I., J. HARTMAN, E. MORAN, B. Z. LEAL, R. J. HAINES et E. M. GAUSE. 1985. Acute soman effects in the juvenile baboon: effects on a match-to-sample discrimination task and on total blood acetylcholinesterase. Pharmacol. Biochem. Behav. 22: 961-966.

GODFREY, W. E. 1986. Les oiseaux du Canada, édition révisée. Musée national des sciences naturelles, Musées nationaux du Canada. Ottawa, 650 p.

GREIG-SMITH, P. W., M. R. FLETCHER, K. HUNTER, M. P. QUICK, A. D. RUTHVEN et I. C. SHAW. 1990. Pesticide poisoning of animals 1988: Investigations of suspected incidents in Great Britain. Report of the environmental panel of the advisory committee on pesticides, MAFF, London, 87 p.

GRUE, C. E. 1982. Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11: 617-626.

GRUE, C. E., A. D. M. HART et P. MINEAU. 1991. Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. Pp. 151-209. Dans: Cholinesterase-inhibiting insecticides. P. Mineau, Éd. Elsevier, New York, 348 p.

GRUE, C. E., et B. K. SHIPLEY. 1981. Interpreting population estimates of birds following pesticide applications - behaviour of male starlings exposed to an organophosphate pesticide. Studies Avian Biol. 6: 292-296.

GRUE, C. E., et B. K. SHIPLEY. 1984. Sensitivity of nestling and adult starlings to dicrotophos, an organophosphate pesticide. Environ. Res. 35: 454-465.

GRUE, C. E., W. J. FLEMING, D. G. BUSBY et E. F. HILL. 1983. Assessing hazards of organophosphate pesticides to wildlife. Trans. N. Am. Wildl. Nat. Resour. Conf. 48: 200-220.

GWINNER, E. 1986. Circannual rhythms in control of avian migrations. Adv. Study Behav. 16: 191-228.

HAHN, T., M. RUHNKE et H. LUPPA. 1991. Inhibition of acetylcholinesterase by the organophosphorus insecticide methylparathion in the central nervous system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Acta Histochem. 91: 13-19.

HARKER, J. E. 1957. Diurnal rhythms in the animal kingdom. Biol. Rev. 33: 1-48.

HART, A. D. M. 1993. Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. Environ. Toxicol. Chem. 12: 321-336.

HASSAN, A., S. M. A. D. ZAYED et M. R. E. BAHIG. 1969. Metabolism of organophosphorus insecticides - XI metabolic fate of dimethoate in the rat. Biochem. Pharmacol. 18: 2429-2438.

HILL, E. F. 1988. Brain cholinesterase activity of apparently normal wildbirds. J. Wildl. Dis. 24: 51-61.

HILL, E. F. et W. J. FLEMING. 1982. Anticholinesterase poisoning in birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. Environ. Toxicol. Chem. 1: 27-38.

HOBBIGER, F. 1976. Pharmacology of anticholinesterase drugs. Pp. 486-581. Dans: Handbook of experimental pharmacology. Neuromuscular, vol. 42. V. P. Whittaker, Éd. Springer-Verlag, New York, 991 p.

HUDSON, R. H., R. K. TUCKER et M. A. HAEGELE. 1984. Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. U.S. Fish Wild. Serv. Resour. Publ. 153.

INNOCENTI, A., L. MINUTINI et A. FOA. 1994. Seasonal changes of locomotor activity patterns in ruin lizards *Podarcis sicula*: II. Involvement of the pineal. Behav. Ecol. Sociobiol. 35: 27-32.

- JOVIC, R. C. 1974. Correlation between biochemical changes in rats poisoned by soman. *Environ. J. Pharmacol.* 25: 159-164.
- KABASAWA, H. et S. OOKA-SOUDA. 1994. Locomotor activity rhythms in the Hagfish under expanded or contracted light-dark cycles. *Fish. Sci.* 60: 21-25.
- KARCZMAR, A. G. 1984. Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. *Fund. Appl. Toxicol.* 4: S1-S17.
- KENDALL, R. J., L. W. BREWER et R. R. HITCHCOCK. 1992. American pigeon mortality associated with turf application of diazinon AG500. *J. Wildl. Dis.* 28: 263-267.
- KOHN-RICHARDS, R. 1939. The influence of temperature and certain hormones upon toxicity of some hypnotics in cold and warm blooded animals. *Am. J. Physiol.* 126: 557-564.
- KOZAR, M. D., D. H. OVERSTREET, T. C. CHIPPENDALE et R. W. RUSSELL. 1976. Changes of acetylcholinesterase activity in three major brain areas and related changes in behavior following acute treatment with diisopropyl fluorophosphate. *Neurophysiology* 15: 292-298.
- LIBERTUN, C. et S. MCCANN. 1974. Further evidence for cholinergic control of gonadotropin and prolactin secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147: 498-504.
- LITTLE, P. J., J. A. SCIMECA et B. R. MARTIN. 1988. Distribution of [3 H]soman, [3 H] sarin and their metabolites in mouse brain. *Drug Metab. Dispos.* 16: 515-520.
- LUDKE, J. L., E. F. HILL et M. P. DIETER. 1975. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3: 1-21.
- MACHIN, A. F., H. ROGERS, A. J. CROSS. M. P. QUICK, L. C. HOWELLS et N. F. JAMES. 1975. Metabolic aspects of the toxicology of diazinon. I. Hepatic metabolism in the sheep, cow, pig, guinea-pig, rat, turkey, chicken and duck. *Pestic. Sci.* 6: 461-473.

- MACINTOSH, F. C. et B. COLLIER. 1976. Neurochemistry of cholinergic neuroterminals. Pp 156-182. Dans: Handbook of experimental pharmacology. Neuromuscular, vol. 42. V. P. Whittaker, Éd. Springer-Verlag, New York, 991 p.
- MACKNESS, M. I., H. M. THOMPSON, A. R. HARDY et C. H. WALKER. 1988. Distinction between "A" esterases and arylesterases - implications for esterase classification. *Biochem. J.* 245: 293-296.
- MAGUIRE, C. C. et B. A. WILLIAMS. 1987a. Cold stress and acute organophosphorus exposure: interaction effects on juvenile Northern Bobwhite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16: 477-481.
- MAGUIRE, C. C. et B. A. WILLIAMS. 1987b. Response of thermal stressed Bobwhite to organophosphorus exposure. *Environ. Pollu.* 47: 25-39.
- MAIN, A. R. 1979. Mode of action of anticholinesterases. *Pharmac. Ther.* 6: 579-628.
- MARIMUTHU, G., S. RAJAN et M. K. CHANDRASHEKARAN. 1981. Social entrainment of circadian rhythm in the flight activity of Microchiropteran bat (*Hipposideros speoris*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 8: 147-150.
- MARTON, A. V., E. A. SELLERS et W. KALOW. 1962. Effect of cold on rat chronically exposed to malathion. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 1671-1676.
- MASSOULIÉ, J., L. PEZZEMENTI, S. BON, E. KREJCI et F.-M. VALLETTE. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41: 31-91.
- MCDUFF, J. 1995. L'influence de la température environnementale sur la température corporelle et l'acétylcholinestérase cérébrale de l'Étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) exposé au diméthoate. Mémoire de maîtrise. No III 994. Université de Sherbrooke. 102 p.
- MCEWEN, L. C., et R. L. BROWN. 1966. Acute toxicity of diedrin and malathion to wild Sharp-Tailed Grouse. *J. Wildl. Manage.* 30: 604-611.
- MECK, W. H. 1983. Selective adjustment of the speed of the interval clock and memory processes. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Process.* 9: 171-201.

- MEETER, E. 1971. The mechanism of action of intraventricular carbachol on the body temperature of the rat. *Int. Pharmacodyn.* 194: 318-328.
- MEETER, E. et O. L. WOLTHIUS. 1968. The effects of cholinesterase inhibitors on the body temperature of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 4: 18-24.
- MENDELSSOHN, H. 1962. Mass destruction of bird life owing to secondary poisoning from insecticides and rodenticides. *Atl. Natur.* 17: 244-251.
- MENDELSSOHN, H. et U. PAZ. 1977. Mass mortality of birds of prey caused by azodrin, an organophosphorus insecticide. *Biol. Conser.* 11: 163-170.
- MINEAU, P. 1991. Difficulties in the regulatory assessment of cholinesterase-inhibiting insecticides. Pp 277-299. Dans: *Cholinesterase-inhibiting insecticides*. P. Mineau, Éd. Elsevier, New York, 348 p.
- MINEAU, P. et D. B. PEAKALL. 1987. An evaluation of avian impact assessment techniques following broad-scale forest insecticide sprays. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 781-791.
- MINORS, D. S. et J. M. WATERHOUSE. 1986. Circadian rhythms and their mechanisms. *Experimentia* 42: 1-108.
- MURPHY, S. D. 1966. Response of adaptative rat liver enzymes to acute poisoning by organophosphate insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8: 266-276.
- MURPHY, S. D. 1969. Some relationships between the effects of insecticides and other stress conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 160: 366-377.
- MYERS, R. O. 1987. Cholinergic systems in the central control of the body temperature. Pp 373-390. Dans: *Neurobiology and Acetylcholine*. N. J. Dun et R. L. Perlman, Éd. Plenum Press, New York, 563 p.
- NACHMANSOHN, D. 1972. Biochemistry as part of my life. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 1-28.

NAMBA, T. et D. GROB. 1968. Cholinesterase activity of the motor end plate in isolated muscle membrane. *J. Neurochem.* 15: 1445-1454.

O'BRIEN, R. D. 1967. *Insecticides: action on metabolism.* Academic Press, New York, 332 p.

O'BRIEN, R. D. 1976. *Insecticide biochemistry and physiology, acetylcholinesterase and its inhibition.* Academic press, New York, 296 p.

PACKER, K. 1975. *Nanogen Index. A dictionary of pesticides and chemical pollutants.* Nanogens International, Freedom, 226 p.

PEAKALL, D. B. et J. R. BART. 1983. Impacts of aerial application of insecticides on forest birds. *CRC Critical Rev. Environ. Control* 13: 117-165.

PELFRENE, A. F. 1991. Synthetic organic rodenticides. Pp 1271-1316. Dans: *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 3. W. J. Hayes Jr et E. R. Laws Jr, Éd. Academic Press, Toronto, 1576 p.

RADVANYI, A., P. KROEGER, D. G. BUSBY et G. G. SHAW. 1986. Response of quail, pheasants, and sparrows to one oral dose of dimethoate and to consumption of dimethoate treated bran baits. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 616-621.

RAMA, D. B. K. et K. JAGA. 1992. Pesticide exposure and cholinesterase levels among farm workers in the Republic of South Africa. *Sci. Total Environ.* 122: 315-319.

RASLEAR, J. C. et L. W. KAUFMAN. 1983. Diisopropyl fluorophosphate disrupts circadian activity patterns. *Neurobehav. Toxicol.* 5: 407-411.

RATTNER, B. A. et A. FAIRBROTHER. 1991. Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity. Pp 89-107. Dans: *Cholinesterase-inhibiting insecticides.* P. Mineau, Éd. Elsevier, New York, 348 p.

RATTNER, B. A. et D. J. HOFFMAN. 1984. Toxicity of acephate in laboratory mice, white-footed mice and meadow voles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 483-491.

RATTNER, B. A. et J. C. FRANSON. 1984. Methyl parathion and fenvalerate toxicity in American Kestrel *Falco sparverius* : acute physiological responses and effects of cold. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62: 787-792.

RATTNER, B. A., J. M. BECKER et T. NAKATSUGAWA. 1987. Enhancement of parathion toxicity to quail by heat and cold exposure. Pestic. Biochem. Physiol. 27: 330-339.

RATTNER, B. A., L. SILEO et C. G. SCANES. 1982. Hormonal responses and tolerance to cold of female quail following parathion ingestion. Pestic. Biochem. Physiol. 18: 132-138.

REINER, E. 1971. Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. WHO Bull. 44: 109-112.

REIS, D. J. 1975. Neural Basis of Violence and Aggression. Dans: Central Neurotransmitters in Aggressive Behavior. W. S. Fields et W. H. Sweet, Éd. Warren H. Green, St-Louis, Pp. 57-84.

ROBINSON, C. P. et D. BEIERGROHSLEIN. 1980. Cholinesterase inhibition by methamidophos and its subsequent reactivation. Pestic. Biochem. Physiol. 13: 267-273.

RUIZ DE GALARRETA, C. M., L. F. FANJUL et J. MEITES. 1981. Influence of cholinergic and anticholinergic drugs on plasma luteinizing hormone and prolactin levels in male and female rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 168: 185-191.

SANTONE, K. S. et G. POWIS. 1991. Mechanism of tests for injuries. Pp 169-214. Dans: Handbook of pesticide toxicology, vol. 1. W. J Hayes Jr. et E. R. Laws Jr, Éd. Academic Press, Toronto, 496 p.

SATYADEVAN, S., S. KUMAR et M. TEMBHRE. 1993. Acetylcholinesterase activity and enzyme kinetics in the brain of common carp *Cyprinus carpio* subjected to sublethal exposure to dimethoate. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1566-1567.

SCHAFER, E. W. 1972. The acute oral toxicity of 369 pesticidal, pharmaceutical and other chemicals to wild birds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 21: 315-330.

SHEMANO, I. et M. NICKERSON. 1958. Effect of ambient temperature on thermal responses to drugs. Can. J. Biochem. Physiol. 36: 1243-1249.

SILVER, A. 1974. The biology of cholinesterases. Frontiers of Biology, vol. 36. North-Holland, Amsterdam, 595 p.

SMITH, G. J. 1987. Toxicology and pesticide use in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds. U.S. Fish and Wildl. Serv. Res. Pub. 170: 1-171.

SPENCER, E. Y. 1968. Guide to chemicals used in crop protection. Canada Departement of Agriculture, Ottawa, Publication no 1093, 106 p.

STANLEY, P. I. et M. R. FLETCHER. 1981. A review of wildlife incidents investigated from October 1978 to September 1979. Pestic. Sci. 252: 55-63.

STICKEL, W. H. 1974. Effects on wildlife of newer pesticides and other pollutants. Ann. Cont. West Assoc. State Game and Fish Comm. 53: 484-487.

SWINGLAND, I. R. 1976. The influence of light intensity on the roosting times of the Rook (*Corvus frugileus*). Anim. Behav. 24: 154-158.

TACHA, T. C., S. J. SCHACHT, R. R. GEORGE et E. F. HILL. 1994. Anticholinesterase exposure of White-winged Doves breeding in lower Rio Grande Valley, Texas. J. Wildl. Manage. 58: 213-217.

THOMPSON, H. M., C. H. WALKER et A. R. HARDY. 1988. Avian esterases as indicators of exposure to pesticides: the factor of diurnal variation. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41: 4-11.

TOUTANT, J.-P. et J. MASSOULIÉ. 1988. Cholinesterases: Tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. Handbook Exp. Pharmac. 85: 225-265.

TRAJANO, E. et L. MENNA-BARRETO. 1996. Free-running locomotor activity rhythms in cave-dwelling catfishes, *Trichomycterus* sp., from Brazil (Telostei, siluriformes). Biol. Rhythm Res. 27: 329-335.

VAN'T HOFF, J. H. 1894. Étude de dynamique physique. Amsterdam.

VANDER, A. J., J. H. SHERMAN et D. S. LUCIANO. 1980. Human physiology. The mechanisms of body function. McGraw-Hill, Toronto, 724 p.

WALKER, C. H. et H. M. THOMPSON. 1991. Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. Pp. 1-17. Dans: Cholinesterase-inhibiting insecticides. P. Mineau, Éd. Elsevier, New York, 348 p.

WALKER, C. H. et M. I. MACKNESS. 1987. "A" esterases and their role in regulating the toxicity of organophosphates. Arch. Toxicol. 60: 30-33.

WEIHE, W. H. 1973. The effect of temperature on the action of drugs. Annu. Rev. Pharmacol. 13: 409-425.

WESTLAKE, G. E., A. D. MARTIN, P. I. STANLEY et C. H. WALKER. 1983. Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain. Comp. Biochem. Physiol. 76C: 15-24.

YAWETZ, A. Z., Z. ZOOK-RIMON et A. DOTAN. 1993. Cholinesterase profiles in two species of wild birds exposed to insecticide sprays in their natural habitat. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 501-509.

ANNEXE 1

INFORMATIONS ADDITIONNELLES CONCERNANT L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase

Les pesticides organophosphorés (OPs) produisent leurs effets toxiques, tant létaux que non létaux, en inhibant l'activité hydrolytique des cholinestérases (ChEs), et plus particulièrement celle de l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui entraîne une accumulation d'acétylcholine (ACh) aux jonctions nerveuses (O'Brien 1967, Corbett 1974). Les ChEs sont des estérases qui, sous des conditions optimales, catalysent l'hydrolyse des cholinesters à une vitesse plus grande que les autres esters. De plus, par définition, les ChEs sont inhibées par de faibles concentrations de physostigmine et d'OPs (Silver 1974, Massoulié *et al.* 1993). Les ChE's font donc partie du grand groupe des estérases qui interagissent avec les OPs. Ce groupe des estérases est lui-même divisé en deux classes: les A-estérases qui hydrolysent les OPs et les B-estérases qui sont inhibées pas les OPs (Aldridge 1953, Walker et Thompson 1991).

Ces deux types d'estérases interagissent avec les OPs en suivant le même mécanisme (Aldridge 1953), cependant elles diffèrent par le taux auquel l'enzyme phosphorylé (par l'OP) réagit avec l'eau pour relâcher, d'une part, l'enzyme intact et, d'autre part, l'acide phosphorique (Gallo et Lawryk 1991). Les B-estérases, qui incluent les ChE's (dont fait partie l'AChE), réagissent avec les OPs mais deviennent fermement, et dans certains cas irréversiblement, phosphorylées et donc inhibées par ce processus. À l'opposé, les A-estérases hydrolysent rapidement les molécules d'OPs (Gallo et Lawryk 1991). L'absence ou le faible niveau en A-estérases dans le plasma sanguin des oiseaux (Brealey *et al.* 1980, Mackness *et al.* 1988) semble être le facteur majeur qui explique leur grande sensibilité aux OPs (Machin *et al.* 1975, Brealey *et al.* 1980, Westlake *et al.* 1983, Walker et Mackness 1987).

Pour l'AChE des vertébrés, l'ACh est le substrat naturel ou préférentiel, c'est-à-dire celui pour lequel l'enzyme montre une activité hydrolytique maximale (Silver 1974). L'ACh est

le médiateur chimique qui accomplit la transmission physiologique des impulsions nerveuses entre: (a) les neurones pré ganglionnaires et post ganglionnaires des systèmes nerveux sympathique et parasympathique, (b) les neurones post ganglionnaires et les organes effecteurs (système parasympathique) ou les neurones post ganglionnaires et les glandes sudoripares (système sympathique), (c) les nerfs moteurs et les muscles squelettiques, (d) les neurones de plusieurs noyaux du système nerveux central (Gallo et Lawryk 1991, Bardin *et al.* 1994).

En réponse à la conduction d'un potentiel d'action le long de la fibre présynaptique, l'ACh est relâchée des terminaisons des fibres cholinergiques. Son contact avec le récepteur postsynaptique engendre un nouveau potentiel d'action sur ce neurone et c'est ainsi que s'accomplit la transmission de l'influx nerveux. Sous des circonstances normales, l'ACh est hydrolysée par l'AChE presque instantanément et il n'y a alors pas d'accumulation. Le fonctionnement normal de l'ACh et de la transmission nerveuse dépend de la destruction rapide de l'ACh par l'AChE (Gallo et Lawryk 1991).

L'AChE existe sous plusieurs formes moléculaires (Brimijoin 1983, Massoulié *et al.* 1993) et on le retrouve en grandes concentrations sur toute la longueur des neurones cholinergiques (MacIntosh et Collier 1976). Par son rôle dans l'hydrolyse de l'ACh, l'AChE est responsable de la terminaison de la connexion électrochimique entre deux cellules nerveuses (Smith 1987). Normalement, l'AChE hydrolyse l'ACh en deux fragments inactifs: la choline et l'acide acétique (Bardin *et al.* 1994). L'activité de l'AChE est affectée par la température et le pH. La température optimale d'action de l'AChE chez les mammifères varie entre 37 et 40 °C (Augustinsson 1948). Le pH optimum se situe autour de 8,0 à 8,5 lorsque l'ACh est utilisé comme substrat (Cohen et Oosterbaan 1963)

L'AChE réagit extrêmement rapidement; son taux d'activité est parmi les plus élevés de tous les enzymes (Silver 1974). Nachmansohn (1972) a calculé que les enzymes associés à 1 g de membrane excitable de l'organe électrique de l'anguille pouvait hydrolyser plus de 30 kg d'ACh par heure. Barnards et Rogers (1967) ont estimé que 95 % des molécules d'ACh relâchées à une terminaison nerveuse est hydrolysées en 1 msec. Les molécules d'AChE d'un seul synapse sont capables d'hydrolyser environ $2,7 \times 10^8$ molécules d'ACh en 1

msec, ce qui dépasse largement les $3 \text{ à } 6 \times 10^6$ molécules relâchées pour chaque influx nerveux (Namba et Grob 1968).

Le centre actif de l'AChE contient deux sous-sites, le premier, chargé négativement, est appelé le site anionique et le deuxième, le site estérasique, qui contient une partie acide (électrophile) et une partie basique (nucléophile) (Silver 1974, Main 1979, Massoulié *et al.* 1993). Le site estérasique doit être protoné pour être actif (Hobbiger 1976). La figure 1 présente l'hydrolyse de l'ACh et du diméthoate par l'AChE. Elle se fait comme suit: (A) l'ACh est liée par les forces de Van der Waals et Coulombique au site anionique chargé négativement et orienté de façon à ce que le groupe carbonyle soit présenté au site estérasique et, alors, le complexe enzyme-substrat est formé; (B) il y a échange d'électrons au site estérasique et la choline est libérée laissant derrière elle un enzyme acétylé; (C) en réagissant avec l'eau, l'enzyme acétylé est hydrolysé très rapidement libérant de l'acide acétique ce qui résulte en la restauration du site actif (Silver 1974).

Les OPs sont également des esters et ils réagissent avec l'AChE de façon similaire à la réaction entre l'AChE et son substrat naturel, l'ACh. La plupart des OPs, comme le diméthoate, n'ont pas de charge positive sur le groupement acide, alors ils réagissent seulement avec le site estérasique (Gallo et Lawryk 1991). Que ce site soit impliqué ou non, la division du groupe estérifié de l'OP (E) est entièrement analogue à la division de la choline lors de l'hydrolyse de l'ACh. Toutefois, le lien entre l'atome de phosphore et le site estérasique de l'enzyme est plus stable que le lien entre l'atome de carbone (de la partie acétate de l'ACh) et le site estérasique de l'enzyme. Ainsi, le bris du lien carbone-enzyme de l'ACh est complet en quelques microsecondes alors que le bris du lien entre l'enzyme et le phosphore (F) requiert entre 1 heure et plusieurs semaines (1 à >1000 heures), selon le composé impliqué (Gallo et Lawryk 1991). Le nombre de molécules hydrolysées par minute par molécule d'AChE est de 300000 pour l'ACh et de 0,008 pour les OPs (Santone et Powis 1991). L'enzyme phosphorylé est inhibé car son site actif est occupé pour une longue période de temps et ainsi, il est incapable d'effectuer ses fonctions normales (Gallo et Lawryk 1991, Santone et Powis 1991).

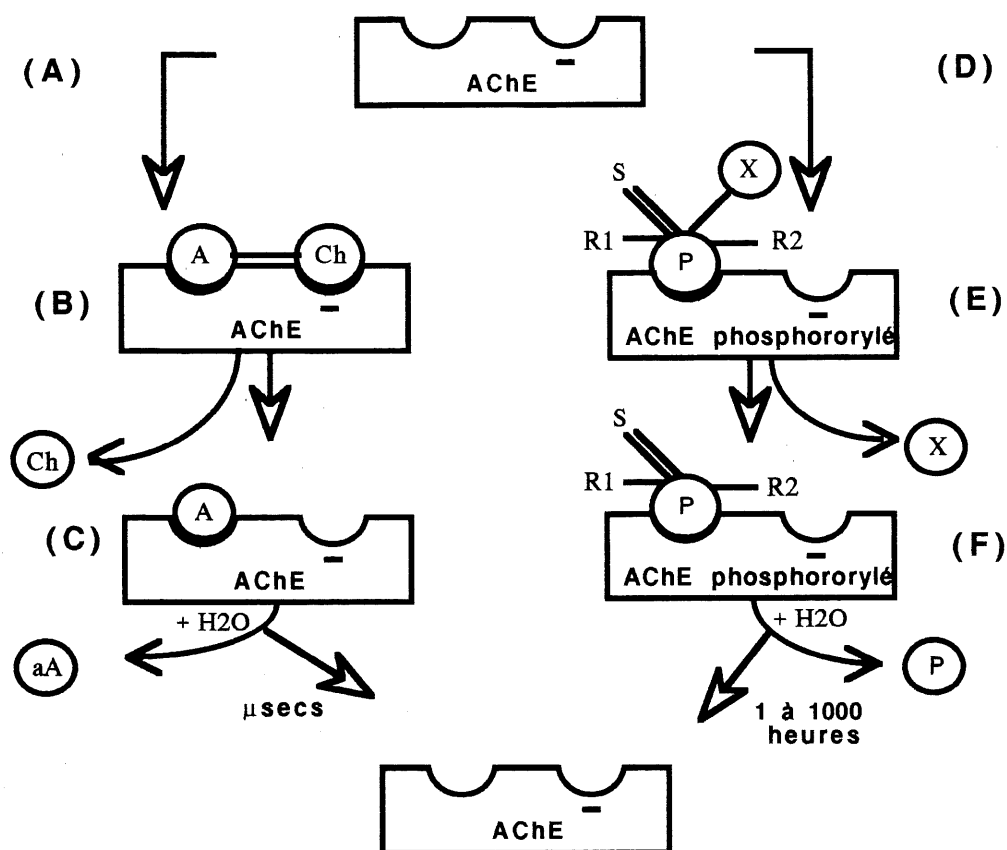


Figure 1. Schéma de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase (A, B, C) et de l'hydrolyse d'un produit organophosphoré (le diméthoate) par l'acétylcholinestérase en trois étapes (D, E, F). ACh= acétylcholine, OP= organophosphoré, AChE= acétylcholinestérase (enzyme), A= acétyle, Ch= choline, aA= acide acétique, X= $\text{SC}_3\text{H}_6\text{ON}$ (groupe partant), $\text{R}_1 = \text{CH}_3\text{O}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{O}$, P = Phosphore, S= soufre.

L'hydrolyse de l'enzyme phosphorylé, aussi appelée réactivation spontanée (E), devient progressivement moins efficace en fonction du temps. Une portion des enzymes phosphorylés est réactivée, mais une portion toujours grandissante devient complètement résistante à la réactivation et on dit qu'elle subit le processus de vieillissement («aging») (Aldridge et Reiner 1972). Le taux de vieillissement dépend de l'agent phosphorylateur et aussi de la température et du pH. Plus la température est basse alors plus la réaction est lente. Plus le pH est bas alors plus la réaction est rapide (Silver 1974). Une fois que

l'enzyme a subi le vieillissement, il est irréversiblement inhibé et le seul moyen pour l'animal de retrouver une activité normale d'AChE est la synthèse de nouveaux enzymes (Gallo et Lawryk 1991).

Le taux de réactivation spontanée de l'enzyme inhibé par un OP dépend du pH et de la température, mais également des forces ioniques et du type d'inhibiteur (Main 1979). Le taux de réactivation est beaucoup plus important à des températures élevées. Cette réactivation existe dans tous les cas d'inhibition par un OP mais, au cours d'une expérience qui dure quelques heures, le taux est extrêmement faible et les effets physiologiques d'un rétablissement sont négligeables (Reiner 1971). Pour cette raison, la réaction d'inhibition est souvent dite irréversible en pratique, car le taux de réactivation spontanée est trop lent pour produire un effet significatif en quelques heures (Silver 1974).

La déphosphorylation ou réactivation spontanée des ChE's inhibées ainsi que la synthèse de nouveaux enzymes sont les principaux facteurs qui amènent le rétablissement de l'activité cholinergique (O'Brien 1976). Pour la plupart des pesticides, l'effet net de ces facteurs est un rétablissement initial rapide, jusqu'à 50-60 % du niveau normal, suivi d'un retour plus lent à la normale (Robinson et Beiergrohslain 1980, Fleming 1981). La phase rapide du rétablissement initial représente l'effet de la réactivation spontanée alors que la phase lente du rétablissement est linéaire et dépend de la synthèse de nouveaux enzymes (Gallo et Lawryk 1991).

ANNEXE 2

MÉTHODE D'ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase CÉRÉbraLE

La méthode utilisée pour déterminer le taux d'activité enzymatique de l'AChE est celle de Ellman *et al.* (1961) telle que modifiée par Hill et Fleming (1982). Le pourcentage d'inhibition des individus traités est déterminé à partir de la valeur moyenne de l'activité de l'AChE des témoins (en $\mu\text{moles/min/g}$ de poids frais de cerveau) qui représente un niveau d'activité d'AChE de 100 %.

1. Principe de la méthode

L'acétylcholinestérase hydrolyse l'acétylthiocholine iodée (ASChi) en thiocholine et acétate. La thiocholine réagit avec l'acide dithiodinitrobenzoïque (DTNB) et le produit de la réaction prend une coloration jaune pouvant être mesurée au spectrophotomètre à 405 nm. Le taux auquel la couleur est produite représente l'activité de l'AChE.

2. Préparation des réactifs

Les réactifs sont préparés et maintenus à la température de la pièce (25 °C) la journée de l'analyse enzymatique.

Réactifs 1: Tampons Tris: mélange de HCL Trizma et de base Trizma dans de l'eau désionisée.

- Réactif 1a: Tampon Tris 0,05 M à pH de 7,4 (25 °C). On ajoute 6,61 g de HCL Trizma et 0,97 g de base Trizma par litre d'eau désionisée
- Réactif 1b: Tampon Tris 0,05 M à pH de 8,0 (25 °C). On ajoute 4,44g de HCL Trizma et 2,65g de base Trizma par litre d'eau désionisée

Réactif 2: Tampon chromogène DTNB. On ajoute 99 mg de DTNB $2,5 \times 10^{-4}$ M par litre de réactif 1a.

Réactif 3. Substrat ASChi. On ajoute 451 mg d'acéthylthiocholine iodée 0,156M par 10 ml d'eau désionisée.

3. Préparation des échantillons

Chaque cerveau est homogénéisé dans le réactif 1b selon un rapport de 100 mg de cerveau par ml de réactif.

4. Dosage de l'activité enzymatique

Les analyses sont effectuées à la température de la pièce (25 °C) à l'aide d'un spectrophotomètre.

a) Dans une cellule à spectrophotométrie on ajoute:

- 3,0 ml de réactif 2
- aliquot de 20 μ l de l'homogénat de cerveau
- 100 μ l de réactif 3

b) On couvre la cellule de parafilm et la retourne doucement pour effectuer le mélange. On laisse écouler 30 à 60 secondes pour que le mélange se stabilise et pour faire disparaître les bulles

c) À une longueur d'ondes de 405 nm on lit l'absorbance à toutes les 30 secondes pendant 3 minutes.

d) On calcule le changement d'absorbance par la différence de l'absorbance entre deux lectures. On calcule ensuite le changement d'absorbance moyen par minute ($\Delta A/\text{min}$ moyen).

e) Le taux d'activité enzymatique pour le cerveau se calcule comme suit:

$\Delta A/\text{min moyen} \times 130 =$ l'activité de l'AChE cérébrale en
 $\mu\text{moles/minute/g}$ de poids frais